

**Etablierung des Hühnerembryonenmodells zur Darstellung von Infektionen  
mittels Positronenemissionstomographie / Computertomographie  
(PET / CT) am Beispiel von *Chlamydophila psittaci***

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich - Schiller - Universität Jena

von

**Diplom Biologin Lydia Friedrich**

geboren am 25.08.1981 in Erfurt

Jena, im Oktober 2012

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hans-Peter Saluz, Jena
2. Prof. Dr. Dietmar Gottschild, Jena
3. Prof. Dr. Jörg Kotzerke, Dresden

Tag der Disputation: 28.Mai 2013

*Für Elise, Arved & Klaus*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XI</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Hühnerembryonenmodell</b>	<b>1</b>
1.1.1 Entwicklung des Hühnerembryos	1
1.1.2 Die Chorioallantoismembran (CAM) als Modellsystem	3
<b>1.2 <i>Chlamydiaceae</i></b>	<b>4</b>
1.2.1 Taxonomie der <i>Chlamydiaceae</i>	4
1.2.2 Entwicklungszyklus der Chlamydien	5
1.2.3 Humanmedizinische Erkrankungen als Folge der Chlamydieninfektion	6
1.2.4 Wirts – Pathogen - Interaktionen	7
1.2.5 Metabolismus der Chlamydien	9
<b>1.3 Bildgebende Diagnostik mittels PET / CT</b>	<b>10</b>
1.3.1 Grundlagen der nuklearmedizinischen Diagnostik mittels PET / CT	10
1.3.2 Grundlagen der Diagnostik mit [ <sup>18</sup> F] - FDG – PET / CT	11
1.3.3 Physiologische <i>versus</i> zelluläre molekulare Bildgebung	13
<b>1.4 Zielstellung</b>	<b>15</b>
<b>2. MATERIAL</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Zelllinie und Chlamydienstamm</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Hühnereier</b>	<b>17</b>
<b>2.3 Medien</b>	<b>17</b>
<b>2.4 Lösungen und Puffer</b>	<b>17</b>
<b>2.5 Chemikalien</b>	<b>19</b>
<b>2.6 Größenstandard</b>	<b>20</b>
<b>2.7 Antikörper</b>	<b>20</b>
<b>2.8 Kit</b>	<b>20</b>
<b>2.9 Geräte</b>	<b>20</b>
<b>2.10 Verbrauchsmaterialien</b>	<b>21</b>
<b>2.11 Software</b>	<b>22</b>
<b>3. METHODEN</b>	<b>23</b>

<b>3.1. Zellbiologische Methoden</b>	<b>23</b>
3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen	23
3.1.2 Kultivierung von <i>Cp. psittaci</i>	23
<b>3.2. Methoden zum Umgang mit embryonierten Hühnereiern</b>	<b>25</b>
3.2.1 Herkunft und Bebrütung der Hühnereier	25
3.2.2 Absenkung der CAM	25
3.2.3 Inokulation der Hühnerembryonen mit <i>Cp. psittaci</i>	25
3.2.4 Präparation von Hühnerembryonen	26
3.2.5 Herstellung Kathetersystem für intravaskuläre Applikation	26
3.2.6 Intravaskuläre Applikation von Hühnerembryonen <i>in ovo</i>	27
<b>3.3. Anästhesie von Hühnerembryonen</b>	<b>28</b>
3.3.1 Anästhesie mittels Urethan und Alpha - Chloralose (UC)	28
3.3.2 Anästhesie mittels Avertin	28
3.3.3 Anästhesie mittels Isofluran	28
<b>3.4 LigandTracer®White - Technologie</b>	<b>29</b>
<b>3.5 Antikörpermarkierung mit Zirkonium - 89</b>	<b>31</b>
3.5.1 Entsalzen und Umpuffern des Antikörpers	32
3.5.2 Antikörperlabeling mit <sup>89</sup> Zr	32
3.5.3 Dünnschichtchromatographie (DC)	32
3.5.4 SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - Page)	33
<b>3.6 Immunhistochemie</b>	<b>33</b>
3.6.1 Herstellung von Kryostatschnitten und Acetonfixierung	33
3.6.2 Peroxidase – Anti – Peroxidase (PAP) – Technik	33
3.6.3 Entwässern mittels aufsteigender Alkoholreihe	34
3.6.4 Quantifizierung der Invasivität von <i>Cp. psittaci</i>	34
<b>3.7 Positronenemissionstomographie/Computertomographie (PET / CT)</b>	<b>35</b>
3.7.1 Vorbereitung der Hühnereier für die PET / CT – Messung	35
3.7.2 Optimierung der Isofluran - Narkose für die PET / CT – Messung	35
3.7.3 CT - Messung, Applikation des Tracer und PET - Messung	35
3.7.4 Rekonstruktion	37
3.7.5 Versuchsaufbau und –ablauf der PET / CT - Messung mittels [ <sup>18</sup> F] - FDG	37
3.7.6 Versuchsaufbau und –ablauf der PET / CT - Messung mittels <sup>89</sup> Zirkonium - markiertem Antikörper	38
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Anästhesie von Hühnerembryonen</b>	<b>39</b>
4.1.1 Kriterien der Anästhesie	39
4.1.2 Bestimmung der eingesetzten Menge des Anästhetikums	40
4.1.2.1 Urethan / α - Chloralose (UC)	40
4.1.2.2 Avertin	41
4.1.2.3 Isofluran	43
4.1.3 Überleben der Embryonen	45
4.1.3.1 UC - Anästhesie	45
4.1.3.2 Avertin	45
4.1.3.3 Isofluran	45

<b>4.2 Etablierung der intravaskulären Applikation von Tracern an Hühnerembryonen <i>in ovo</i> für PET / CT - Analysen</b>	<b>46</b>
<b>4.2.1 Intravaskuläre Applikation mittels Kathetersystem</b>	<b>46</b>
4.2.2 Anwendung des Kathetersystems am Beispiel des Knochenmarkers [ $^{18}\text{F}$ ] - Fluorid	47
4.2.3 Optimierung des Kathetersystems	49
<b>4.3 LigandTracer® - System zur <i>in vitro</i> - Charakterisierung einer Chlamydieninfektion</b>	<b>50</b>
4.3.1 Adaptierung des LigandTracer® - Systems zur <i>in vitro</i> - Charakterisierung von <i>Cp. psittaci</i> - Infektionen	51
4.3.2 Messung der [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Aufnahme <i>Cp. psittaci</i> - infizierter BGM - Zellen und deren Vergleich mit nicht - infizierten Zellen	52
<b>4.4 Untersuchung von <i>Cp. psittaci</i> -Infektionen am embryonierten Hühnerei mittels [<math>^{18}\text{F}</math>] - FDG</b>	<b>53</b>
4.4.1 Physiologisches Aktivitätsverteilungsmuster von [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG <i>in ovo</i>	54
4.4.3 Quantitative Auswertung der [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation <i>in ovo</i>	55
4.4.4 Histologischer Nachweis von <i>Cp. psittaci</i> in Leber und Milz infizierter sowie nicht - infizierter Embryonen	58
<b>4.5 Untersuchung von <i>Cp. psittaci</i> - Infektionen am embryonierten Hühnerei mittels <math>^{89}\text{Zr}</math> - markierter chlamydienspezifischer Antikörper</b>	<b>60</b>
4.5.1 $^{89}\text{Zr}$ - Markierung eines anti – Chlamydia – LPS - Antikörpers	61
4.5.2 Physiologische Aktivitätsverteilung von reinem $^{89}\text{Zr}$ und $^{89}\text{Zr}$ - Antikörper <i>in ovo</i> am Beispiel uninfizierter Embryonen	62
4.5.3 Quantitative Auswertung der $^{89}\text{Zr}$ - Antikörper Akkumulation	63
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>66</b>
<b>5.1 Anästhesie von Hühnerembryonen</b>	<b>66</b>
<b>5.2 Adaption der intravaskulären Applikation an das PET / CT - System</b>	<b>71</b>
<b>5.3 Adaption des <i>Cp. psittaci</i> – <i>in vitro</i> - Infektionsmodells an das LigandTracer® - System</b>	<b>73</b>
<b>5.4 Untersuchung des Glukosestoffwechsels infolge einer <i>Cp. psittaci</i> - Infektion <i>in vitro</i> unter Anwendung von [<math>^{18}\text{F}</math>] - FDG am LigandTracer® - System</b>	<b>75</b>
<b>5.5 Untersuchung von <i>Cp. psittaci</i> - Infektionen am embryonierten Hühnerei mittels [<math>^{18}\text{F}</math>] - FDG</b>	<b>77</b>
<b>5.6 Untersuchung von <i>Cp. psittaci</i> - Infektionen am embryonierten Hühnerei mittels <math>^{89}\text{Zr}</math> - Antikörper</b>	<b>84</b>
<b>6. AUSBLICK</b>	<b>89</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>90</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>XI</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>XIII</b>
<b>FORMELVERZEICHNIS</b>	<b>XIII</b>

<b>DANKSAGUNG</b>	<b>XIV</b>
<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>XV</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>XVI</b>
<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>XVII</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ca.	circa
°	Grad
°C	Grad Celsius
$\beta^+$	Positron
$\beta^-$	Elektron
$\gamma$	Photon
$\mu\text{A}$	Mikroamper
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
AB	<i>Aberrant Body</i> (Aberrantes Körperchen)
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Chlamydia</i>
$^{11}\text{C}$	Kohlenstoff
Ca	Kalzium
CADD	<i>Chlamydia protein Associating with Death Domain</i>
CAM	Chorioallantoismembran
Cfu	<i>Colony forming units</i> (koloniebildende Einheiten)
cm	Zentimeter
$\text{CO}_2$	Kohlendioxid
Cp.	<i>Chlamydophila</i>
CPAF	<i>Chlamydial Protease/ Proteasome-like Activity Factor</i>
Cps	<i>Counts per second</i> (Zählimpulse pro Sekunde)
CT	Computertomographie
CTP	Cytidintriphosphat
$^{64}\text{Cu}$	Kupfer - 64
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dünnschichtchromatographie
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Deoxyribonukleinsäure)



DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EB	<i>Elementary Body</i> (Elementarkörperchen)
EBE	einschlussbildende Einheit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme - linked Immunosorbent Assay</i>
ELT	Entwicklungstag
<sup>18</sup> F	Fluor - 18
[ <sup>18</sup> F] - FDG	2 – Fluor - 2Deoxy – D - Glukose
FCS / FBS	<i>Fetal Calf Serum / Fetal Bovine Serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FUO	<i>Fever of Unknown Origin</i> (Fieber unbekannter Ursache)
g	Gramm
g	Beschleunigung
G	Gauge
<sup>68</sup> Ga	Gallium - 68
Glut	Glukosetransporter
GTP	Guanosintriphosphat
h	<i>hour</i> , Stunde
HCl	Salzsäure
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (humanes Immundefizienzvirus)
HPLC	<i>High - Performance Liquid Chromatographie</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
IB	<i>Intermediate Body</i> (Intermediärkörperchen)
ID	<i>Injected Dose</i> (Injizierte Dosis)
IgG	Immunglobulin G
Inc	<i>Inclusion membrane protein</i>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di - Kaliumhydrogenphosphat
KeV	Kiloelektronenvolt
L	Liter
L2	Sicherheitsstufe 2 im Labor
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MBq	Megabecquerel
MeV	Megaelektronenvolt

Mg	Magnesium
MHC I / II	<i>Major Histocompatibility Complex I / II</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Milimeter
mM	Milimolar
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i> (Anzahl infektiöser Einheiten pro Zelle)
MOMP	<i>Major Outer Membrane Protein</i>
MR	Magnetresonanz
NaCl	Natriumchlorid
NF - $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor kappa – light – chain - enhancer of activated B cell</i>
Omp	<i>Outer membrane protein</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS	<i>Phosphate - Buffered Saline</i> (Phosphat - gepufferte Salzlösung)
PET	Positronenemissionstomographie
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RB	<i>Reticulate Body</i> (Retiklarkörperchen)
Rf	Retentionsfaktor
rRNA	<i>ribosomal Ribonucleic Acid</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROI	<i>Region Of Interest</i> (Bereich von Interesse)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> (Natriumdodecylsulfat)
sec	<i>second</i> , Sekunde
SNARE	<i>Soluble NSF - sensitive Attachment Receptor</i>
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i> (Einzelphotonen - Emissionscomputertomographie)
SPF	spezifiziert pathogenfrei
Tab.	Tabelle
Tarp	<i>Translocated actin - recruiting phosphoprotein</i>
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethylendiamin
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
UC	Urethan / Alpha - Chloralose
UTP	Uridintriphosphat
(v / v)	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen bei Prozentangeban)
wo	<i>without</i>

(w / v)	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen bei Prozentangaben)
z.B.	zum Beispiel
<sup>89</sup> Zr	Zirkonium - 89

## Zusammenfassung

Das *in vivo* - Verfahren der Positronenemissionstomographie / Computertomographie (PET / CT) ist ein fester Bestandteil der modernen bildgebenden Diagnostik. Funktionsbasierte und anatomische Informationen werden durch Bildfusion kombiniert und erlauben die präzise drei- und vierdimensionale Visualisierung physiologischer als auch pathologischer Vorgänge. Neben klinischen Fragestellungen wird dieser Methode zunehmende Bedeutung in der biomedizinischen Grundlagenforschung beigemessen. Diese kommt bislang jedoch ohne die Anwendung von Tierversuchen nicht aus. Eine Alternative stellen Hühnerembryonen dar, deren Vorzüge unter anderem in der standardisierten Bebrütungs- und Infektionsmethodik, den geringen Kosten für Haltung und Beschaffung sowie der Einordnung als Nicht - Tierversuch zu sehen sind.

Zentrales Anliegen dieser Arbeit war die Etablierung der PET / CT als bildgebendem Verfahren im Rahmen der Anwendung des Hühnerembryos zur Untersuchung infektionsbiologischer Fragestellungen. Um das Potential dieses Modellsystems zu erhöhen, wurde die Visualisierung von Infektionsprozessen *in ovo* anhand des aviären zoonotischen Erregers *Chlamydotheca psittaci* (*Cp. psittaci*) untersucht.

Die Visualisierung des Infektionsgeschehens *in ovo* bedingt die kontrastreiche Darstellung der Hühnerembryonen während der PET / CT-Datenaufnahme und machte die Etablierung anästhetischer Maßnahmen notwendig. Evaluiert wurden die Injektionsnarkotika Urethan /  $\alpha$  - Chloralose und 2,2,2-Tribromethanol (Avertin) sowie das Inhalationsnarkotikum Isofluran an 10 bis 18 Tage alten Hühnerembryonen. Alle benannten Anästhetika konnten erfolgreich zur artefaktfreien Darstellung *in ovo* eingesetzt werden. Vor dem Hintergrund wiederholender Narkoseanwendungen stellte sich Isofluran als das am besten geeignetste Narkotikum heraus. Damit konnten bewegungsartefaktfreie Daten mit Hilfe einer im Gerät integrierten Narkoseeinheit über längere Untersuchungszeiträume hinweg akquiriert werden.

PET / CT - Untersuchungen basieren zumeist auf einer intravaskulären Applikation eines radioaktiv markierten Biomoleküls (Tracer). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Injektionsroute an das Hühnerembryonenmodell adaptiert und stellt die Grundlage für eine direkte, minimal - invasive Applikation in ein Blutgefäß der Chorioallantoismembran (CAM) dar. Mit Hilfe eines selbst hergestellten Kathetersystems konnten Gefäße 10 bis 18 Tage alter Hühnerembryonen erfolgreich punktiert werden. Zudem wurden Mehrfachinjektionen desselben Individuums realisiert. Die Funktionalität und reproduzierbare Anwendbarkeit des Injektionssystems wurde am Beispiel des Knochenmarkers [ $^{18}\text{F}$ ] - Fluorid erfolgreich getestet. Ein weiteres Novum stellt die Tracerinjektion am Hühnerembryo bei simultaner PET / CT - Datenaufnahme als Grundlage zur Beantwortung kinetischer Fragestellungen dar. Die Substitution der Stahlkanüle des Katheters durch eine Glaskanüle optimiert die CT - Bildgebung durch Reduktion metallinduzierter Artefakte.

Am etablierten Modellsystem wurden zwei alternative Strategien zur dreidimensionalen Darstellung von Wirts - Pathogen - Interaktionen *in ovo* untersucht und deren Anwendbarkeit bewertet. Hierzu wurde Hühnerembryonen der aviäre Erreger *Cp. psittaci* am zehnten Entwicklungstag auf die CAM appliziert und die visuelle Darstellung der Infektionsprozesse unter anästhetischen Bedingungen am sechsten Tag *post infectionem* mittels PET / CT durchgeführt.

Da Infektionsprozesse oft mit einem erhöhten Glukosestoffwechsel verbunden sind, zielte eine Strategie darauf ab, den chlamydialen Erreger mit Hilfe des Glukoseanalogons [<sup>18</sup>F] - FDG nachzuweisen. Aufbauend auf den Ergebnissen eines an das LigandTracer® - System adaptierten *Cp. psittaci* - Infektionsmodells wurde zunächst *in vitro* eine gesteigerte Anreicherung von [<sup>18</sup>F] - FDG in infizierten Zellen nachgewiesen. Additiv wurde *in vivo* die Tracerakkumulation am Hühnerembryo gezeigt und Parallelen zu den in der Literatur beschriebenen Penetrationsschwerpunkten in Leber und Milz festgestellt. Diagnostisch wurden die im PET - Bild dargestellten *hot spots* der Leber sowie der Milz zugeordnet. Histologische Untersuchungen ergaben eine positive Korrelation zwischen Traceranreicherung und Pathogenpenetration. Aufgrund gegebenenfalls auftretenden technischen und individuellen Limitationen wird die Einführung eines Schwellenwertes empfohlen. Auf Basis der erhobenen Daten wurde für pathogene Befunde der Schwellenwert für PET - basierte Volumensegmentierung der Leber auf +5 % ID / g und für die Milz auf +10 % ID / g festgelegt.

Die zweite Strategie basierte auf der direkten Markierung des Pathogens *in ovo*. Diese stützt sich auf die Erregerlokalisation infolge einer Antigen-Antikörper-Interaktion. Dazu wurde der kommerziell bezogene anti - Chlamydia - LPS - Antikörper analog eines adaptierten Protokolls radioaktiv mit dem Langzeitstrahler Zirkonium - 89 markiert und Hühnerembryonen am 6. Tag *post infectionem* intravaskulär appliziert. Anhand der erhobenen PET / CT - Daten konnte keine differenzierte Darstellung physiologischer und pathologischer Tracerakkumulationen vorgenommen werden. Im Rahmen dieses *proof of principle* - Experiments erwies sich die Anwendung radioaktiv markierter Antikörper im Kontext der genannten Ziele am autarken Modellsystem des Hühnerembryos als ungeeignet.

Als Ergebnis der vorliegenden Arbeit steht die erfolgreiche Etablierung des Ersatzmodells Hühnerembryo für die PET / CT. Die Anästhesie sowie die intravaskuläre Applikation von Hühnerembryonen ermöglicht dynamische Messungen mit hohen Auflösungen in beiden Modalitäten. Die physiologische Verteilung als auch die *in vivo* - Stabilität von Biomolekülen kann hiermit drei- und vierdimensional visualisiert werden. Mit dem Standardtracer [<sup>18</sup>F] - FDG wurde die Chlamydieninfektion *in ovo* dargestellt und histologisch bestätigt. Das Potential des Hühnerembryonenmodells wurde beschrieben und kann weitere Forschungsfragen generieren.

**Abstract**

The *in vivo* - technique of positron emission tomography / computer tomography (PET / CT) is an inherent part of modern imaging diagnostics. Functional and anatomical information are combined through image correlation and enables precise three- and four dimensional visualisation of physiological as well as pathologic procedure. Beside clinical questions this method increasingly attaches much importance in biomedical basic research. However, up to now those get along with utilization of laboratory animal only. An alternative are chicken embryos whose advantages amongst others are standardized incubation- and infection methods, low costs for breeding and purchasing as well as classification as a non-animal experiment.

Central concern of this assignment was the establishment of PET / CT as an imaging method in context of utilization chick embryos for investigation of infection - biological questions. The visualization of infection processes *in ovo* were investigated on the basis of the avian zoonotic pathogen *Chlamydophila psittaci* (*Cp. psittaci*) to increase the potential of this model system.

Visualisation of infection *in ovo* bases on high - contrast display during PET / CT data acquisition and has required the establishment of anesthetic method. Evaluated were the injection narcotics urethane /  $\alpha$  - chloralose and 2,2,2 - tribromoethanol (Avertin) as well as the inhalation narcotic isoflurane. Investigations were performed at chicken embryos from day 10 to 18 of incubation. All three anesthetics could be used for acquisition of artifact free images *in ovo* successfully. Regarding repeated applications isoflurane revealed as the best suited narcotic. So that motion artifact free images could be acquired over a long period by the help of an instrument integrated vaporizer.

PET / CT study is mostly based on intravascular application of a radioactive labeled molecule (tracer). In the context of this thesis named injection route was adapted to chicken embryo model and provides the basic for direct, minimum - invasive application into blood vessel of the chorioallantois membrane (CAM). Vessels of chicken embryos from day 10 to 18 could be punctured effective with the aid of a self made catheter system. Furthermore repeated applications of one and the same embryo could be realized. Functionality and repeated application of the injection system was effectively tested using the example of bone marker [ $^{18}\text{F}$ ] - fluoride. Another novelty exhibits the tracer injection at simultaneous PET / CT data acquisition to respond kinetic questions. Exchanging steel cannula of the catheter through a glass needle leads to reduction of metal induced artifacts and by this to an optimization of CT imaging.

For research of three dimensional imaging of host-pathogen-interactions *in ovo* two alternative strategies were examined. Consequentially the practicability of the established model system was benchmarked. For this chicken embryos at day 10 were infected with the avian pathogen *Cp. psittaci* by application onto the CAM. At day six *post infectionem* visual display of infection processes occurred under anesthetic conditions by the help of PET / CT.

Frequently, infection processes are associated with an increased glucose metabolism. Therefore one strategy was aimed to detect the chlamydial pathogen based on application of the glucose analogon [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG. According to the adapted *Cp. psittaci* infection model for the LigandTracer® - system increased tracer accumulation was detected initially *in vitro* at infected cells. Moreover tracer accumulation was revealed *in vivo* by using chicken embryo. Analogies of penetration emphasis according to the literature could be determined. Diagnostically hot spots of the PET view were allocated to liver and spleen. Histological examinations arose a positive correlation of tracer accumulation and pathogen penetration. Due to potentially occurrent technical and individual limitations introduction of a marginal value is commended. Based on acquired data of pathogenic findings a marginal value of 5 % ID / g for liver and 10 % ID / g for spleen was fixed.

Second investigated strategy rests upon direct labeling of pathogen *in ovo*. This draws on pathogen localisation as a result of antigen-antibody-interaction. For this the commercially available anti – chlamydia – LPS - antibody was radioactively labeled with the long lasting emitter circonium - 89 according to an adapted protocol and finally applicated intravascular into chicken embryos at day six *post infectionem*. No sophisticated view of physiological and pathological tracer accumulations was possible with the collected PET / CT data. In the framework of that proof of principle experiment the application of radioactive labeled antibody by using the self-sufficient model system chicken embryo has proofed as unsuitable.

In conclusion of present thesis stands the effective establishment of the alternative model system chicken embryo for PET / CT. Anesthesia as well as intravascular application of chicken embryos allows dynamic measurements with high resolution in both modalities. Physiological distribution and *in vivo* stability of biomolecules can be visualized three and four dimensionally. By using the standard tracer [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG chlamydial infections were detected *in ovo* and confirmed histologically. Potential of the chicken embryo model system was characterized and allows to generate additional research issues.

## 1. Einleitung

*Chlamydomonas psittaci* besitzt als zoonotisch, intrazelluläres Bakterium sowohl human- als auch tierpathogene Bedeutung. Bislang wurden die Interaktionen des Pathogens mit seinem aviären Wirt *in vitro* und *in vivo* insbesondere im Kontext molekularbiologischer Methoden charakterisiert. Der Fokus dieser Arbeit richtet sich auf die Darstellung der Wirts – Pathogen - Interaktionen mittels Positronenemissionstomographie / Computertomographie (PET / CT) am *in vivo* - Modell des embryonierten Hühnereies. Die grundlegenden Determinanten dieses Themenkomplexes sind nachstehend dargestellt.

### 1.1 Das Hühnerembryonenmodell

Der Hühnerembryo weist eine lange und bedeutende Geschichte als Modellsystem auf. Eine große Bedeutung wird dem Modell im Bereich der Entwicklungsbiologie, Immunologie, Genetik, Virologie, Krebsforschung und Zellbiologie beigemessen (Wolpert, 2004; Stern, 2005). Embryonale *in vivo*- als auch *in vitro* - Modellsysteme sind etabliert und ermöglichen umfangreiche Untersuchungen. Die Kombination klassischer Methoden mit neuen Technologien, wie der *in vivo* - Elektroporation, embryonale Stammzelluntersuchungen, Transgenese aber auch die vollständige Entschlüsselung des Genoms, lassen den Hühnerembryo wieder verstärkt in den Fokus der aktuellen Forschung treten (Stern, 2004; Stern, 2005).

Der zunehmende Einsatz von Hühnerembryonen liegt, verglichen mit anderen *in vivo* - Modellsystemen, vor allem in der einfachen Handhabung begründet. Als tierversuchsnahes Modell unterliegt es, solange die Versuche bis zum 18. Bebrütungstag durchgeführt werden, nicht den Tierversuchsbestimmungen. Die gute und kostengünstige Verfügbarkeit in großer Anzahl sowie die schnelle, reproduzierbare Anzucht und Entwicklung (21 Tage bis zum Schlupf) sind von entscheidendem Vorteil. Die embryonale Genese außerhalb des Muttertieres (*in ovo*) erlaubt die optische Beurteilung der Reifungsstadien zu jedem Zeitpunkt und bietet die Möglichkeit, Eingriffe und Untersuchungen vorzunehmen.

#### 1.1.1 Entwicklung des Hühnerembryos

Die Entwicklung des Hühnerembryos findet innerhalb von 21 Tagen statt und vollzieht sich in einem nahezu geschlossenem System fast autark (Bellairs & Osmond, 2005). Lediglich die Gase Sauerstoff und Kohlendioxid sowie Wasserdampf und Wärme können über die Eischale mit der Umwelt ausgetauscht werden. Andere essentielle Stoffe zur Entwicklung, wie Wasser, Mineralien und Nährstoffe werden im Eidotter vor dem Legen eingebracht und stellen die ausschließliche Versorgungsquelle dar.

Der Eidotter entspricht der eigentlichen Eizelle (Dottereinlagerung in Zytoplasma), die im Ovar der Henne entsteht und dort zu ihrer entgültigen Größe heranwächst. Die Formgebung erfolgt durch die Dottermembran, die das Zerfließen des Eigelbs verhindert. Auf dem Dotter befindet sich das



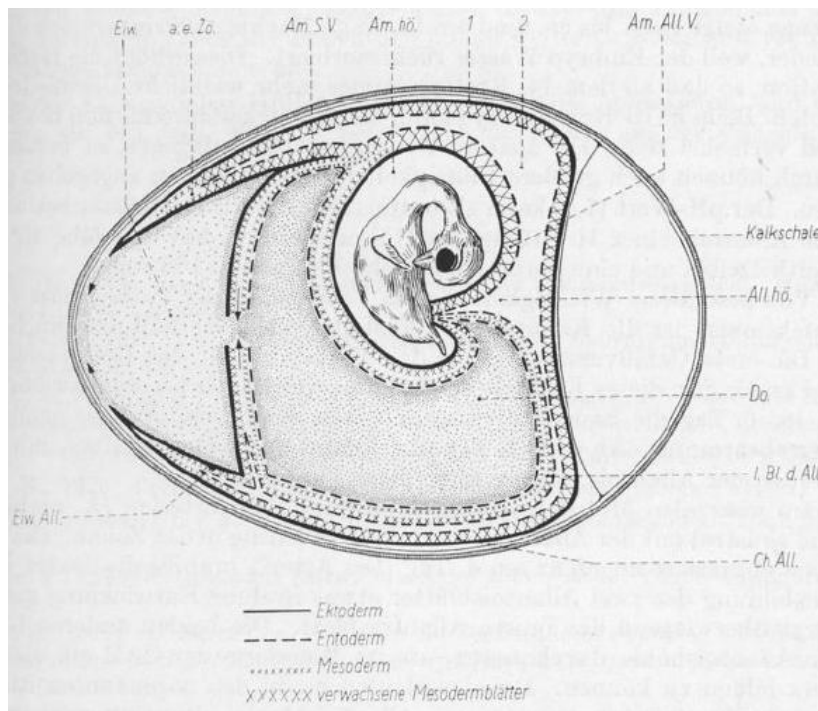
diskusförmige Blastoderm, aus welchem sich im Falle einer Befruchtung der Embryo generiert. Dieser entsteht aber nur aus einem kleinen Teil der dreifach über dem Dotter ausgebildeten Keimblätter. Die Embryonalanlage wird durch den Keimwall vom viel größeren außerembryonalen Keimblattbezirk abgegrenzt und lässt den Embryo immer tiefer in den Dottersack einsinken (am zweiten bis dritten Bebrütungstag). Der außerembryonale Keimblattbezirk dient der Entwicklung der vier extraembryonalen Membranen: Dotter-, Amnion-, Allantois- und Chorionmembran, wobei letztere zur Chorioallantois verschmelzen (Abb. 1; Mayr *et al.*, 1974).

Die Dottersackmembran bildet sich zuerst aus und umschließt den Dotter bereits am fünften Bruttag vollständig. Der Dotter besteht zu 25 % aus Proteinen und zu 75 % aus Lipiden, deren Resorption über die Dottersackmembran erfolgt. Die Lipide werden metabolisiert und vom Embryo für die Wachstumsprozesse verwertet (Stark, 1999). Der durch Eischale und Eiklar diffundierende Sauerstoff wird dem Embryo mittels Dottersackmembran zugeführt.

Das Amnion entsteht durch Faltung extraembryonaler Membranen und bildet final die Amnionhöhle, in der sich der Embryo, in Amnionflüssigkeit schwimmend, entwickeln kann (Romanoff, 1960). Spätestens drei Tage nach Beginn der Bebrütung ist der Embryo komplett vom Amnion umhüllt (Freeman & Vince, 1974). Durch den Auftrieb wird der Embryo zu seinen ihn umgebenden Fruchthüllen auf Distanz gehalten und Verwachsungen werden somit verhindert. Schädliche mechanische sowie thermische Einflüsse werden abgehalten und konstante Wachstumsbedingungen sichergestellt. Zudem wirkt die Amnionmembran als immunologische Barriere mit antimikrobiellen Eigenschaften (Feeney & Nagy, 1952; Romanoff, 1967; Meade 2009).

Die Allantois beginnt sich zwischen dem zweiten und dritten Tag nach Bebrütung zu entwickeln und stellt eine blasenförmige Ausstülpung des Enddarms in die extraembryonale Leibeshöhle dar. Die Allantois legt sich dabei an das Chorion an (Mayr *et al.*, 1974).

Die Chorioallantois entsteht schließlich durch Verschmelzung von Allantois und Chorion, beginnend am Tag fünf bis sechs der Inkubation (Freeman & Vince, 1974). Beim Huhn ist deren Bildung am 12. Bebrütungstag abgeschlossen (Ribatti *et al.*, 2001; Valdes *et al.*, 2002). Die Chorioallantoismembran (CAM) bildet ein dichtes Netzwerk an Blutgefäßen aus, die aber am Bruttag 19 bis 20 nur noch wenig Blut enthalten (Hamburger & Hamilton, 1951). Die von einem dichten Kapillarnetz durchzogene CAM dient der Atmung und Ernährung des Embryos. Durch das sehr dichte Anliegen an der inneren Eischalenmembran können Gase, die durch die Poren der Eischale diffundieren, aufgenommen bzw. abgegeben werden. Während der embryonalen Entwicklung wird Kalzium zunächst aus dem Dottersack, später aber aus der Eischale resorbiert und in den Embryo zur Knochenbildung transportiert (Johnston & Comar, 1955; Crooks & Simkiss, 1974; Akins & Tuan, 1993). Dieser unidirektionale Transport beginnt am Bruttag 10 bis 12 und erreicht sein Maximum am Bruttag 17. Die CAM dient aber auch der Einlagerung stickstoffhaltiger Abbauprodukte.



**Abb. 1: Schematischer Längsschnitt durch ein Hühnerei zwischen dem 10. und 12. Bebrütungstag (Mayr *et al.*, 1974)**

Am.hö. = Amnionhöhle,  
 All.hö. = Allantoishöhle,  
 Am.S.V. = Amnion-Serosa-Verbindung,  
 Am.All.V. = Amnion-Allantois-Verwachsung,  
 a.e.Zö = äußerembryonales Zölon,  
 Ch.All. = Chorioallantois,  
 I.Bl.d.All. = inneres Blatt der Allantois,  
 Eiw. = Eiweiß,  
 Eiw.All. = Eiweißsack-Allantois,  
 Do. = Dotter,  
 1 = Chorioallantoismembranbeimpfung,  
 2 = Beimpfung der Allantoishöhle

### 1.1.2 Die Chorioallantoismembran (CAM) als Modellsystem

Das CAM - Modell ist ein bewährtes System der Wissenschaft, welches vielfältige Anwendungen zulässt. Schalenlose Kultivierungsmethoden (Boone, 1963; Dunn, 1974; Tufan *et al.*, 2004), wie auch Arbeiten *in ovo* sind gut beschrieben und seit Jahren bekannt (Mayr *et al.*, 1974; Deeming & Ferguson, 1991). Trotzdem verlor das System Mitte der 1970er Jahre mit dem abnehmenden Schwerpunkt der Embryonalforschung an Stellenwert. Andere Modellsysteme (Maus, Zebrafisch, Fadenwurm) rückten stärker in den Fokus der Untersuchungen. Lediglich in der Impfstoffproduktion und der Virusvermehrung haben Hühnerembryonen nie an Bedeutung verloren (Fulton & Isaacs, 1952; Tamm & Tyrrell, 1954; Feller *et al.*, 1969; Durupt *et al.*, 2012). Die breite Anwendungsmöglichkeit des Modells sowie die mannigfaltigen Variationen des Systems haben den Fokus der Forschung aktuell wieder verstärkt auf das CAM - Modell gerichtet (Dohle *et al.*, 2009; El-Ghali *et al.*, 2010; Jacobsen *et al.*, 2011; Braukmann *et al.*, 2012). Aufgrund der Funktion als respiratorisches Organ, zeichnet sich die CAM durch eine starke Vaskularisierung aus und prädestiniert sie beispielsweise zur Untersuchung von Angiogeneseprozessen (Ribatti *et al.*, 2001; Staton *et al.*, 2004; Deryugina & Quigley, 2008). Das Modell kann als ethisch unbedenklich angesehen werden, da die CAM nicht mit Nerven durchzogen ist und Untersuchungen als schmerzfrei eingestuft werden können (Dekker, 1988). Neben der Darstellung von normalen und pathologischen Angiogeneseprozessen findet es auch als Retina - Modell Einsatz (Leng *et al.*, 2004). Zu untersuchende Substanzen können direkt auf die CAM aufgebracht und Reaktionen wie die Schädigung von Blutgefäßen oder intravasale Koagulationen beobachtet werden. Es stellt damit eine alternative zum Daize - Augenreizungstest dar. Breite Anwendung findet das CAM - Modell auch zunehmend in der Krebsforschung, wo es zur Untersuchung komplexer, mehrstufiger Prozesse der

Metastasierung eingesetzt wird. Durch die natürliche Immundefizienz (erst ab dem 12. Entwicklungstag bilden die Hühnerembryonen ein Immunsystem aus) werden verpflanzte Tumoren zu Beginn der Entwicklung kaum abgestoßen und können durch die Dreidimensionalität des Systems gut untersucht werden. Es ist zudem ein attraktives Modell zur Untersuchung der Physiologie des Gasaustausches (Tazawa, 1980; Menna & Mortola, 2002), aber auch zur *in vivo* - Studie diverser Biomoleküle (Valdes *et al.*, 2002).

Zunehmend gewinnt das CAM - System auch wieder in der Infektionsbiologie an Bedeutung. In den 1960er und 1970er Jahren vor allem zur Charakterisierung und Vermehrung von Viren eingesetzt, werden in aktuellen Forschungsarbeiten auch Ergebnisse zur Pathogenese und zum Hyphenwachstum von Pilzen beschrieben (Partridge *et al.*, 1971; Gow *et al.*, 2003; Jacobsen *et al.*, 2011). Sogar für die Untersuchung humanpathogener Erreger, die respiratorisch aufgenommen werden, ist das CAM - Modell geeignet. Die Architektur der Mikrozirkulation in der CAM ähnelt der von reifem Lungengewebe (Fuchs & Lindenbaum, 1988). So kann die CAM auch als geeignetes Modell zur Untersuchung aerogen übertragener Chlamydien angewendet werden (Heinmets & Golub, 1948; Braukmann *et al.*, 2012). Die CAM als Untersuchungsobjekt kann also sehr breit und vielfältig eingesetzt werden und darf als Alternative zum Tiermodell angesehen werden (Sugijama *et al.*, 1996; Slodownik *et al.*, 2008).

## **1.2 Chlamydiaceae**

Die Bakterien der *Chlamydiaceae* sind obligat intrazellulär lebende, gram - negative und unbewegliche Zellparasiten. Sie zeichnen sich durch einen charakteristischen, zweiphasigen Vermehrungszyklus innerhalb einer eukaryotischen humanen oder tierischen Wirtszelle aus. Chlamydien sind nicht zu einem vollständigen Energie- und Biosynthesemetabolismus in der Lage, weshalb sie von der Versorgung mit ATP und anderen Intermediaten durch die Wirtszelle abhängig sind.

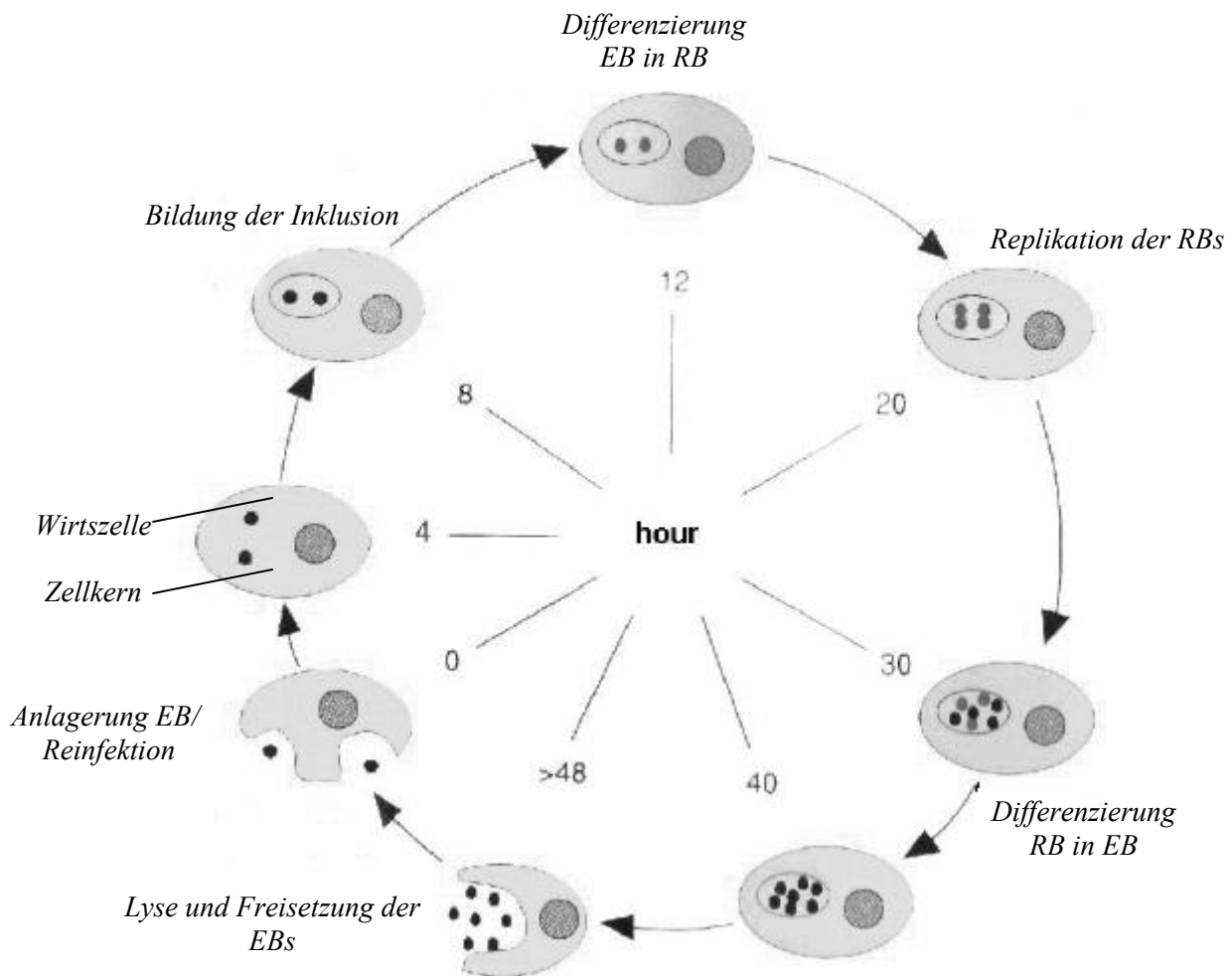
### **1.2.1 Taxonomie der Chlamydiaceae**

Aufgrund ihrer geringen Größe und der nicht möglichen Anzucht in Kulturmedium, wurden sie nach ihrer Entdeckung 1907 von Halberstaedter und Prowazek, zunächst den Viren zugeordnet. 1965 wurde gezeigt, dass es sich bei den Chlamydien um Eubakterien handelt (Moulder, 1966), was 1966 durch Page zur Einführung der Gattung *Chlamydia* führte (Page, 1968). Vor 1999 bestand diese Gruppe lediglich aus einer Familie und einer Gattung (Kaltenboeck *et al.*, 1993). Phylogenetische Sequenzanalysen der 16S- und 23S - rRNA führten schließlich zur Überarbeitung der Taxonomie und zur Einführung der Ordnung *Chlamydiales* (Everett *et al.*, 1999). Danach wird die Familie der *Chlamydiaceae* in die zwei Gattungen *Chlamydia* (3 Spezies) und *Chlamydophila* (6 Spezies) unterteilt. Den *Chlamydia* wird unter anderem der humanpathogene Erreger *Chlamydia* (*C.*) *trachomatis* zugeordnet. Der Genus *Chlamydophila* beinhaltet unter anderem die vorwiegend

humanpathogene Art *Chlamydophila* (*Cp.*) *pneumoniae*. *Cp. abortus* sowie *Cp. psittaci* können zwar auf den Menschen übertragen werden, dieser stellt aber nicht den eigentlichen Wirt dar.

### 1.2.2 Entwicklungszyklus der Chlamydien

Die Vermehrung der Chlamydien läuft obligat intrazellulär in einem komplexen Reproduktionszyklus ab. Dabei kommt es zu einem Wechsel zwischen zwei morphologisch und funktionell verschiedenen Organisationsformen (Moulder, 1991; AbdelRahman & Belland, 2005). Die sporenlähnliche, infektiöse Entwicklungsform wird als Elementarkörperchen (*elementary body*, EB) bezeichnet, ist circa 0,3 µm groß, rund und metabolisch inaktiv. Die intrazellulär replikative Entwicklungsform wird als Retikularkörperchen bezeichnet (*reticulate body*, RB). Diese nicht infektiöse Form ist circa 1 µm groß und metabolisch aktiv.



**Abb. 2: Schematische Darstellung des chlamydialen Lebenszyklus (modifiziert nach Zdrodowska-Stefanow *et al.*, 2003)**

Infektiöse Elementarkörperchen (EB) lagern sich an die Wirtszelle an, internalisieren und differenzieren innerhalb der Inklusion zu Retikularkörperchen (RB), die sich intrazellulär vermehren. Redifferenzierung der RBs zu EBs und anschließende Zelllyse.

Der chlamydiale Replikationszyklus (Abb. 2) wird durch die Anheftung und Aufnahme der infektiösen EBs an ihre Wirtszelle initiiert. Der Eintritt wird durch Adhäsine, unter anderem OmpA (*Outer membrane protein A*), OmcB (*Outer membrane protein B*), MOMP (*Major – Outer – Membrane - Protein*) und HSP70 (*Heat Shock Protein 70*) vermittelt (Hackstadt, 1999). Für die Aufnahme der EBs in die Wirtszelle sind in Abhängigkeit von der Chlamydienspezies und vom Zelltyp endozytotisch, rezeptorvermittelte Wege über Clathrin *coated pits* (Hodinka *et al.*, 1988), aber auch eine mikrofilamentabhängige Phagozytose über Vesikel ohne Clathrin beschrieben (Finlay & Cossart, 1997). Die internalisierten EBs liegen in einer parasitophoren Vakuole (Inklusion), bestehend aus der Vesikelmembran der Wirtszelle, vor (Majeed & Kihlstrom, 1991). Phagolysosomale Verschmelzungen der Inklusion werden unter anderem durch Oberflächenantigene vitaler Chlamydien verhindert. Bereits sechs bis acht Stunden nach der Internalisierung reorganisieren sich die EBs zu RBs. Neben der Zellwand ändert sich während der Replikation auch die Nukleotidstruktur der Chlamydien. Die durch Zweiteilung entstehenden RBs füllen nach 24 Stunden die gesamte Inklusion aus. Später im Entwicklungszyklus entwickeln sich die RBs über Intermediärkörperchen (*intermediate body*, IB) zurück zu EBs, welche durch Zellkern- und Zellwandlyse aus der eukaryotischen Wirtszelle freigesetzt werden und benachbarte Wirtszellen infizieren (Moulder, 1991; Harkinezhad *et al.*, 2009). Ein zweiter, als Extrusion bezeichneter Freisetzungsmechanismus (Hybiske & Stephens, 2007) beschreibt den Austritt der EBs aus der infizierten Zelle ohne deren Zersetzung. Der Entwicklungszyklus dauert *in vitro* speziesabhängig 48 bis 72 Stunden (Rockey *et al.*, 1996).

Neben dem beschriebenen Entwicklungszyklus können Chlamydien auch überdauernde, persistierende Formen ausbilden. Persistente Chlamydien entwickeln keine normalen RBs, sondern bilden in einer kleineren Inklusion morphologisch vergrößerte und diffuse „aberrante“ Körperchen (AB) aus. Die ABs sind nicht teilungsfähig, weisen eine insgesamt veränderte metabolische Aktivität auf und lassen sich nicht anzüchten. Induzierend auf die Ausbildung von ABs wirken sich unter anderem Penicillin, Interferon-Gamma oder Eisen- und Nährstoffmangel aus (Wyrick, 2010). Unter günstigen Umgebungsbedingungen können sich die aberranten Dauerstadien in normal replizierende Chlamydien zurückbilden (Goellner *et al.*, 2006).

### 1.2.3 Humanmedizinische Erkrankungen als Folge der Chlamydieninfektion

Chlamydien verfügen als obligat intrazelluläre Bakterien über ein breites Wirtsspektrum und sind daher weltweit in der Human- als auch in der Tiermedizin epidemiologisch als auch klinisch relevant (Rohde *et al.*, 2010). Bei den humanpathogenen Erregern sind insbesondere *C. trachomatis*, *Cp. pneumoniae* sowie *Cp. psittaci* von Bedeutung.

*C. trachomatis* ist in den Entwicklungsländern vor allem durch die Bildung von Trachomen, in den westlichen Ländern hingegen durch die Übertragung sexueller Krankheiten bekannt.

Infektionen des Respirationstrakts werden vor allem mit *Cp. pneumoniae* in Verbindung gebracht. Die Infektionen verlaufen zumeist asymptomatisch, reichen aber auch von leichten Erkältungssymptomen bis hin zur Bronchitis oder Lungenentzündung.

*Cp. psittaci* infiziert vor allem Vögel (Ornithose) zumeist mit systemischem Krankheitsbild, bei dem vor allem der Intestinal- als auch der Respirationstrakt betroffen sind. Stämme von Vögeln, vor allem Psittaciden (Papageienartige) weisen eine höhere Humanpathogenität als Stämme anderer Tierarten auf. Als Reservoir des Erregers sind zudem Haustiere, wie Katzen, Hunde, Kühe und Schafe zu nennen. Nutzgeflügel, wie Hühner, Enten aber auch Tauben stellen die häufigste Infektionsquelle für den Menschen dar. Durch den Kontakt mit respiratorischen Sekreten und Kot von infizierten Tieren erfolgt eine Übertragung zumeist aerogen auf den Menschen, jedoch sehr selten direkt von Mensch zu Mensch. Die humane Psittacose wird als Ornithose oder Papageienkrankheit bezeichnet. Die Symptome dieser seltenen, aber zumeist schwer verlaufenden Ornithose, umfassen anfangs grippeartige Beschwerden, können aber auch durch schwerwiegende Pneumonien und systemische Manifestation gekennzeichnet sein. Die Erkrankung des Menschen ist in Deutschland meldepflichtig.

#### 1.2.4 Wirts - Pathogen - Interaktionen

Als obligat intrazelluläre Bakterien sind Chlamydien auf eukaryotische Wirtszellen angewiesen. Chlamydiale Interaktionen basieren auf einer Vielzahl von Proteinen, die im Elementarkörperchen bereits synthetisiert vorliegen und die Anlagerung, Internalisierung und das Überleben zu einem frühen Zeitpunkt des Replikationszyklusses sicher stellen. Neu synthetisierte Proteine des Retikularkörperchens hingegen sind für die Manipulation von Wirtszellsignalwegen, Interaktion mit dem Wirtsstoffwechsel und Reinfektion essentiell.

Initial wird die Interaktion der Chlamydien mit der Wirtszelle durch elektrostatische und reversible Interaktionen mit Wirtszellproteoglykanen vermittelt. Kurz nach dem irreversiblen Bindungsschritt des EB, vermittelt das Typ – III - Sekretionssystem den Transfer chlamydialer Proteine, wie z.B. Tarp (*Translocated actin-recruiting phosphoprotein*) in das Wirtszellzytosol. Tarp wird zügig an Tyrosinresten durch eine Ras - GTPase des Wirts phosphoryliert (Carabeo *et al.*, 2004; Lane *et al.*, 2008) und vermittelt durch die Bildung und Rekrutierung von Aktinfilamenten an der Anheftungsstelle die Internalisierung der EBs (Jewett *et al.*, 2006).

Einmal internalisiert, modifizieren die Chlamydien die sie umschließende Inklusion und entgehen damit der phagolysosomalen Verschmelzung im Rahmen der Wirtsabwehr. Durch den Lipidtransfer aus verschiedenen Wirtszellkompartimenten (Golgi - Apparat, Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum) wird die Zusammensetzung der Inklusion der Wirtszelle nachempfunden. SNARE (*Soluble NSF - sensitive attachment receptor*) Proteine sind in der uninfizierten Zelle am intrazellulären *trafficking* und der Membranfusion beteiligt. In der Inklusionsmembran befindliche Inc - Proteine besitzen SNARE - ähnliche Motive, die eine Reihe an

Wirtszell - SNARE binden und somit Einfluss auf die Membranfusion der Wirtszelle nehmen können (Delevoe *et al.*, 2008).

Ein weiteres in das Wirtszytosol sezerniertes chlamydiales Effektorprotein zur Manipulation der Wirtsabwehr ist CPAF (*Chlamydial Protease / proteasome - like Activity Factor*). Diese Typ – II - sekretierte Serin-Protease degradiert die Transkriptionsfaktoren USF - 1 und RFX-5 des Wirts, wodurch die MHC I / II (*Major Histocompatibility Complex*) vermittelte Antigenpräsentation in infizierten Zellen unterdrückt wird (Zhong *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2004). Neben der Manipulation des angeborenen Immunsystems ist die Einflussnahme auf die Apoptose für die Replikation der Chlamydien von entscheidender Bedeutung. Die Degradation pro-apoptotischer BH3 - *only* Proteine wird ebenfalls mit CPAF in Verbindung gebracht (Paschen *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008). Die erhöhte Expression des anti - apoptotischen Proteins Mcl - 1 in infizierten Zellen führt zur Aktivierung des Raf / MEK / ERK - Signalwegs (Rajalingam *et al.*, 2008), der die inflammatorische Wirtsantwort beeinflusst (Buchholz & Stephens, 2007) und zur Akquise von Lipiden beiträgt (Su *et al.*, 2004).

NF -  $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa – light – chain - enhancer of activated B cell*) ist ein Transkriptionsfaktor der für die angeborene und adaptive Immunität des Wirtssystems essentiell ist. Die Interaktion mit diesem Signalweg ist daher für die replikative intrazelluläre Vermehrung der Chlamydien von immanenter Bedeutung. (Lad *et al.*, 2007). Das Heterodimer NF -  $\kappa$ B, bestehend aus den Untereinheiten RelA (p65) und p50, agiert im Zellkern als Transkriptionsaktivator (Hayden *et al.*, 2006). Lad *et al.* (2007) wiesen die Spaltung von p65 durch die chlamydiale Protease CT441 nach, wodurch die NF -  $\kappa$ B Aktivierung und folgende Entzündungsreaktionen durch die Wirtszelle unterbunden werden. Modulationen des NF –  $\kappa$ B - Signalwegs durch Chlamydien sind auch im Bereich der Ubiquitin - vermittelten Proteindegradation beschrieben. Die Translokation von NF -  $\kappa$ B in den Zellkern geht mit der Degradation ihres Inhibitors I $\kappa$ B -  $\alpha$  über Ubiquitin - vermittelte Proteolyse einher (Sun & Ley, 2008; Cocchiario & Valdivia, 2009). Die unterbundene Ubiquitylierung und Degradation des Inhibitors gehen mit der Blockade des NF -  $\kappa$ B Signalwegs einher (Negrate *et al.*, 2008).

Nach dem vollständigen Ablauf des Replikationszyklusses und der Redifferenzierung der RBs in infektiöse EBs, initiieren die Chlamydien den Zelltod und stellen das Austreten aus der Wirtszelle sicher. Die Freisetzung mittels Zelllyse ist mit dem Abbau der Inklusion und der Wirtszelle verbunden (Cocchiario & Valdivia, 2009). Der durch Hybiske *et al.* (2007) beschriebene Mechanismus der Extrusion hingegen, beschreibt den Austritt der membranumgebenen Inklusion aus der Zelle, ohne diese zwingend zu schädigen. In infizierten Zellen konnte das chlamydiale Effektorprotein CADD (*Chlamydia Protein Associating with Death Domain*) als Modulator der Wirtszellapoptose nachgewiesen werden. Das im Entwicklungszyklus der Chlamydien spät exprimierte CADD interagiert mit Todesdomänen von Tumornekrosefaktor (TNF) - Rezeptoren und induziert somit die Fas - abhängige Apoptose (Stenner - Liewen *et al.*, 2002).

### 1.2.5 Metabolismus der Chlamydien

Die Versorgung mit Metaboliten ist entscheidend für die Pathogenese obligat intrazellulär lebender chlamydialer Spezies. Diverse Mechanismen, die den Import und die Inkorporation von Nährstoffen, Aminosäuren, Lipiden und anderen Metaboliten von der Wirtszelle ermöglichen kompensieren unvollständige Biosynthesewege (Saka *et al.*, 2010). Die Akquise der Nährstoffe ist unzureichend charakterisiert, was im Fehlen geeigneter Modellsysteme zur Untersuchung begründet liegt.

Pyrimidin- und Purin - Nukleotide sind im Rahmen der Replikation zur Nukleotidsynthese sowie zur Energieversorgung essentiell, können jedoch von Chlamydien nicht neu synthetisiert werden. Enzyme ermöglichen zwar die Generierung von ATP (Substratlevelphosphorylierung) sowie CTP aus UTP mittels CTP Synthetase, ersetzen jedoch nicht die Aufnahme von ATP, GTP und UTP direkt aus der Wirtszelle (McClarty & Fan, 1993). Für *C. trachomatis* sind die zwei essentiellen Proteine Npt1 und Npt2 für den Nukleosidphosphat-Transport beschrieben (Tjaden *et al.*, 1999). Der Npt1 - vermittelte Import von ATP aus der Wirtszelle in Richtung Pathogen geht mit einem Export von ADP einher. Npt2 hingegen vermittelt den Protonen - abhängigen Transport der vier Nukleotide GTP, UTP, CTP und ATP. Npt1 ist demnach vor allem für die chlamydiale Energieversorgung immanent, wohingegen Npt2 primär der Nukleotidaufnahme für anabole Reaktionen (Tjaden *et al.*, 1999) dient. Additiv zu den Nukleotiden müssen zur Replikation notwendige Aminosäuren aufgrund unvollständiger Biosynthesewege über das Wirtssystem bezogen werden. Diverse Aminosäuretransporter wie beispielsweise *aat* (Aminosäuretransporter) und *xasA* (Aminosäureantiporter) sowie verschiedene ABC - Transporter zum Aminosäure- und Oligopeptidtransport sind bekannt (Read *et al.*, 2003; Saka & Valdivia, 2010; Braun *et al.*, 2008). Die genannten Mechanismen der Nährstoffaufnahme beziehen sich auf Transportwege der bakteriellen Membran. Weitestgehend unklar ist jedoch der Nährstofftransport vom Wirtszytosol in die Inklusion, besonders vor dem Hintergrund, dass Moleküle > 520 Da die Inklusionsmembran nicht passieren können (Heinzen *et al.*, 1996).

Interaktionen mit dem Golgi - Apparat, Mitochondrien und Lipidtröpfchen der Wirtszelle sind neben der Pathogenese essentiell zur chlamydialen Replikation (Kumar *et al.*, 2006; Heuer *et al.*, 2009). Durch die Interaktion der wirtseigenen Vesikel mit der chlamydialen Inklusion, erfolgt die Versorgung des Pathogens mit Lipiden und anderen Nährstoffen. In der Bindung und Penetration der Vesikel mit der Inklusion, scheint neben IncA auch das chlamydiale Protein Lda3 (*Lipid droplet associated*) involviert zu sein (Cocchiari *et al.*, 2008).

Die Vielfalt chlamydialer, hoch adaptierter Wege zur Aufnahme von Metaboliten und deren Vorstufen aus der Wirtszelle haben zum Erfolg dieser Pathogene beigetragen. Dabei nimmt der Wirt durchaus keine versorgende Funktion ein, sondern versucht primär das Pathogen zu zerstören (Saka & Valdivia, 2010).



### 1.3 Bildgebende Diagnostik mittels PET / CT

Seit der kommerziellen Einführung der integrierten PET / CT - Diagnostik 2001 ist die simultane Untersuchung morphologischer und funktioneller Zusammenhänge möglich. Durch die Kopplung zweier etablierter Verfahren, PET und CT, wird die diagnostische Genauigkeit erhöht, was zum schnellen Einzug dieser Methode im klinischen aber auch Forschungsalltag beitrug. Primär in der Krebsdiagnostik (Beyer *et al.*, 2000; Cohade *et al.*, 2003; Shim *et al.*, 2005; Antoch *et al.*, 2010), aber auch zur Untersuchung von Demenz (Herholz *et al.*, 2007; Mountz, 2007 a; Berti *et al.*, 2011) und Epilepsie (Jolles *et al.*, 1989; Mountz, 2007 b) findet dieses Verfahren breiten Zuspruch. Zunehmend werden auch inflammatorische und infektionsbiologische (Rennen *et al.*, 2000; Blockmans *et al.*, 2001; Piwnica - Worms *et al.*, 2004; Vos *et al.*, 2006) Fragestellungen mittels PET / CT bearbeitet.

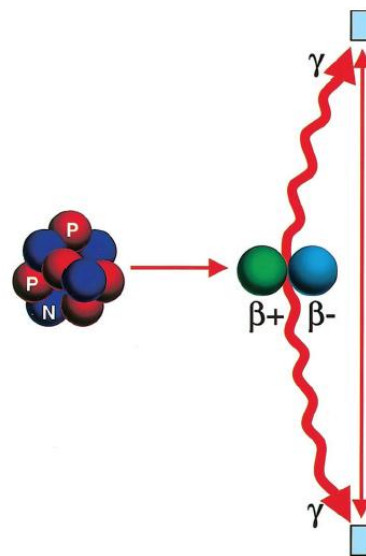
#### 1.3.1 Grundlagen der nuklearmedizinischen Diagnostik mittels PET / CT

Die PET stellt ein nicht-invasives, bildgebendes Verfahren dar, welches die *in vivo* - Verteilung von zumeist systemisch applizierten, Positronen - emittierenden Radionukliden (Betastrahler) aufzeigt. In dreidimensionalen Schnittbildern können biochemische und physiologische Funktionen abgebildet und metabolische bzw. funktionelle Fragestellungen ohne Gewebsentnahme gemessen und lokalisiert werden (funktionelle Bildgebung).

Das Prinzip der PET beruht auf der Wechselwirkung eines vom Isotop emittierten Positrons mit einem Elektron, nach einer Laufstrecke von ca. 1 mm im Untersuchungsobjekt. Dabei werden zwei Photonen von je 511 KeV freigesetzt und voneinander entgegengesetzt, in einem Winkel von 180°, ausgesandt (Abb. 3). Die beiden Gammaquanten entstehen also gleichzeitig und bewegen sich auf einer Linie voneinander weg, wobei sich ihre elektrischen Ladungen aufheben (annihilieren).

Diese photonische Strahlung wird von zwei sich gegenüberliegenden Detektoren als zeitliches Koinzidenzereignis aufgenommen und in ein elektrisches Signal umgewandelt (Kapoor *et al.*, 2004; Bockisch *et al.*, 2006; Ametamey *et al.*, 2008).

Der PET - Scanner ist aus einem Detektorring mit mehreren nebeneinander liegenden Blockdetektoren (16 Detektorblöcke mit je 4 Detektoren) aufgebaut. Die in Koinzidenz geschalteten



**Abb. 3: Prinzip der Annihilation (Kapoor *et al.*, 2004)**

Vom Isotop emittierte Positronen ( $\beta^+$ ) annihilieren mit Elektronen ( $\beta^-$ ), wodurch anschließend zwei koinzidente 511 keV - Photonen ( $\gamma$ ) freigesetzt werden, welche von Szintillationskristallen (blau) detektiert werden.  
N = Neutron;  
P = Proton

Detektoren bestehen aus Kristallen (Lutetium - Oxyorthosilicat), welche über einen Lichtleiter mit einer positionsempfindlichen Photomultiplieröhre verbunden sind. Aufgrund der ringförmigen Anordnung des Detektors, können Koinzidenzereignisse während des Untersuchungszeitraums aus vielen Winkeln registriert werden. Mittels computertomographischer Algorithmen kann die räumliche Verteilung der radioaktiven Substanz im Untersuchungsvolumen berechnet werden. Koinzidenzereignisse innerhalb einer Detektorebene werden einem Schnittbild zugeordnet. In diesen Schnittbildern ist die regional gemessene Aktivitätsmenge der örtlichen Tracerkonzentration im Gewebe proportional (Phelps, 2000; Kapoor *et al.* 2004).

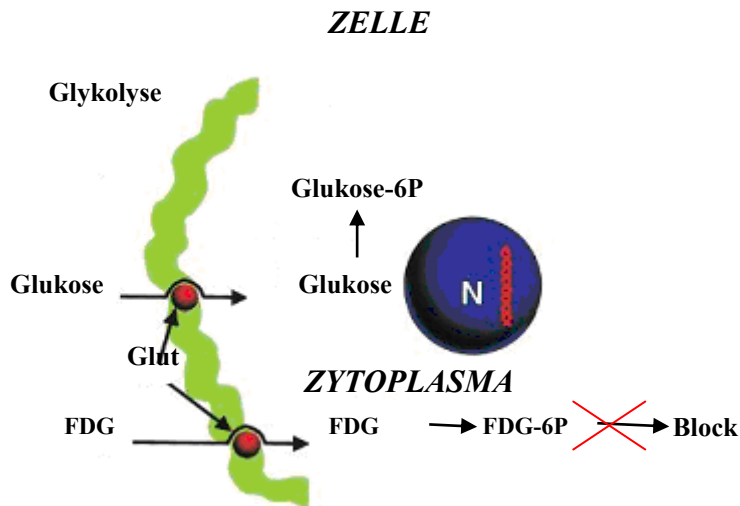
Analog der PET, werden auch bei der CT Schichtuntersuchungen durchgeführt. Die röntgenologische Aufnahme der Daten beruht jedoch auf der Rotation einer Röntgenröhre sowie eines Detektors um das Untersuchungsobjekt. Ein eng begrenztes Strahlenbündel durchdringt das Objekt und wird in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Struktur verschieden stark geschwächt. Absorptionsprofile werden aufgrund der auftretenden Absorption in allen Richtungen erstellt und durch einen Detektor auf der gegenüberliegenden Seite aufgezeichnet. Der Vergleich zwischen ausgesandter und gemessener Strahlungsintensität gibt Aufschluss über die Abschwächung der Strahlung (Attenuation) durch das untersuchte Gewebe (Grillenberger & Fritsch, 2007). Mittels computergestützter Bildrekonstruktion werden für jedes Volumenelement des Objektes (Voxel) der Absorptionsgrad ermittelt und ein Bild errechnet (Schulze, 2007).

Die PET - Technologie bildet zwar physiologische als auch pathologische Ereignisse ab, limitiert sich aber durch die geringe anatomische Detailinformation. Erst durch die Kombination mit einem CT können die biologischen Informationen mit anatomischen Schichtbildern fusioniert werden und ermöglichen die Übertragung der Einzelmodalitäten aufeinander. Bei einem solchen Kombinationsgerät sind die beiden Tomographen eng hintereinander gesetzt miteinander verbunden und ermöglichen so die Überlagerung der Bildinformationen aus PET und CT ohne weitere Manipulationen. Somit wird ein zeitlicher Versatz zwischen beiden Modalitäten verringert und ein dreidimensionaler Versatz verhindert (Bockisch *et al.*, 2006).

### 1.3.2 Grundlagen der Diagnostik mit [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG – PET / CT

Für die molekulare Bildgebung mittels PET stehen in Abhängigkeit von der Fragestellung eine Auswahl unterschiedlichster Moleküle sowie eine Vielzahl von Positronenstrahlern (z.B. die Isotope  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ) zur Verfügung. Die häufigste Anwendung findet jedoch das Glukoseanalogon [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG, welches durch die Möglichkeit metabolische Prozesse darzustellen, eine übergeordnete Stellung eingenommen hat. Die immanente Bedeutung liegt neben dem breiten Anwendungsspektrum und der guten Verfügbarkeit in der sehr sensitiven, hochauflösenden Bildgebung begründet. [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG wird durch die Kopplung von  $^{18}\text{F}$  (Halbwertszeit 110 min) an Deoxyglukose generiert und intravaskulär appliziert. Die Anwendung von [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG basiert auf dessen Aufnahme in stoffwechselaktiven Zellen, vermittelt über Glukosetransporter (Abb. 4). Intrazellulär wird [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG

durch eine Hexokinase zu  $[^{18}\text{F}]$  - FDG - 6 - Monophosphat phosphoryliert. Anschließende metabolische Umsetzungen finden nicht statt, wodurch es zur Akkumulation des Tracers in den Zellen kommt (Kapoor *et al.*, 2004; Ametamey *et al.*, 2008; Glaudemans & Signore, 2010).



**Abb. 4:  $[^{18}\text{F}]$  - FDG - Aufnahme und Akkumulation (modifiziert nach Kapoor *et al.*, 2004)**

Das Glukoseanalogon  $[^{18}\text{F}]$  - FDG wird in metabolisch aktiven Zellen durch Glukosetransporter (Glut) über die Zellmembran hinweg aufgenommen. Im Zytoplasma wird  $[^{18}\text{F}]$  - FDG zu  $[^{18}\text{F}]$  - FDG - 6 - Phosphat phosphoryliert (6P), welches nicht weiter metabolisiert wird und in der Zelle akkumuliert (N = Nukleus).

Ursprünglich zur Untersuchung physiologischer und pathologischer Zustände des Gehirns eingeführt, wird  $[^{18}\text{F}]$  - FDG aktuell sehr vielfältig, vor allem in der onkologischen Diagnostik eingesetzt. Basierend auf einer zumeist gesteigerten Expression von Transportproteinen für Glukose, einhergehend mit einem erhöhten Glukosestoffwechsel, können abnormale Anreicherungen in malignem Gewebe beobachtet werden. In diversen Studien konnte die Funktionalität der  $[^{18}\text{F}]$  - FDG - PET zur Tumordiagnostik gezeigt und Rückschlüsse auf die Lokalisation von bösartigem Gewebe gezogen werden. Immanente Bedeutung wird  $[^{18}\text{F}]$  - FDG auch bei der Diagnostik von kardialen und gastrointestinalen Erkrankungen zugesprochen, wo es auch therapiebegleitend routinemäßig angewendet wird (Kamel *et al.*, 2004; Schwaiger *et al.*, 2005; Louis *et al.*, 2007; Beeres *et al.*, 2007).

Trotz der großen Erfolge in der Tumordiagnostik bleibt zu bemerken, dass es sich bei  $[^{18}\text{F}]$  - FDG um einen unspezifischen Tracer handelt. Neben physiologischen Akkumulationen beispielsweise im Gehirn oder Myokard, wurden kurz nach der methodischen Einführung Anreicherungen von  $[^{18}\text{F}]$  - FDG in posttraumatischem Gewebe nachgewiesen. Basierend auf der gesteigerten Glykolyse und einer vermehrten Expression an Glukosetransportern durch Entzündungszellen, wie Granulozyten und Makrophagen, können erhöhte intrazelluläre  $[^{18}\text{F}]$  - FDG-Aufnahmen beobachtet werden (Kumar *et al.*, 2008). Aufbauend auf diesen Beobachtungen wurde  $[^{18}\text{F}]$  - FDG - PET auch zur Diagnostik von Entzündungs- und Infektionsprozessen eingesetzt. Der Schwerpunkt der aktuellen Forschung liegt dabei auf der bildlichen Darstellung benigner Infektionen von Lunge, Darm und Gallenblase. Entzündungen ohne Infektionshintergrund wie Sarkoidose (Aide *et al.*, 2007; Keijsers *et al.*, 2008), abdominale Aneurismen der Aorta (Truijers *et al.*, 2008; Reeps *et al.*, 2009) sowie Arthritis (Beckers *et al.*, 2004) können nachgewiesen werden. Zudem werden bakterielle und fungale Infektionen des

Skeletts (Osteomyelitis; Entzündungen von Prothesen) und der Weichteile (FUO; HIV-Aids) zuverlässig dargestellt (Love *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2008; Glaudemans & Signore, 2010).

### 1.3.3 Physiologische *versus* zelluläre molekulare Bildgebung

Mit dem Ziel physiologische als auch pathologische Zustände zu beobachten, wurde die Entwicklung bildgebender Verfahren, ausgehend vom ersten Mikroskop, kontinuierlich vorangetrieben. Die Bildgebung unterstützt das Verständnis für Prozesse, die bei der Entstehung, Erkennung sowie Diagnose von Erkrankungen immanent sind und wirkt unterstützend auf die Entwicklung neuer Therapieansätze ein. Invasive als auch nicht - invasive Methoden sind grundlegend aus dem Forschungs- und Klinikalltag nicht mehr wegzudenken. Aktuell sind zur Detektion, Charakterisierung und Visualisierung biologischer Prozesse diverse mikroskopische und molekulare Verfahren bekannt, die sich verschiedener Nachweisprinzipien bedienen. Generell werden diese Methoden, aufbauend auf ihrer Auflösungs- (makroskopisch, mesoskopisch oder mikroskopisch) und Informationsebene (anatomisch, physiologisch, zellulär oder molekular) unterteilt (Weissleder & Pittet, 2008).

Molekulare und zelluläre Bildgebungstechniken, die auf mikroskopischer Ebene arbeiten, generieren Informationen zu biochemischen Aktivitäten von Zellen und deren Molekülen. Pathogene Einflüsse sowie Interaktionen, beispielsweise auf pharmakologischer Ebene, können dargestellt werden. Die hohe räumliche Auflösung verglichen mit anderen Technologien, wie PET oder SPECT, ist von hohem Stellenwert. Molekulare und zelluläre Bildgebungstechniken bedienen sich unterschiedlicher etablierter Methoden. Neben älteren Verfahren der Lichtmikroskopie (nicht-fluoreszierende Hellfeldmikroskopie, Kontrastmikroskopie) stehen vor allem fluoreszenzmikroskopische Techniken sowie *optical probes* (markierte Moleküle, die Licht verschiedener Wellenlänge emittieren und somit der Differenzierung von Zielzelle und umliegenden Zellen dienen) im Fokus der mikroskopischen Forschung. Zur mikroskopischen Bildgebung werden routinemäßig Zellkulturen humaner bzw. tierischer Herkunft oder biopsiertes Gewebe verwendet. Biochemische Aktivitäten, Interaktionen zwischen Zellen oder Molekülen, Genexpression, Zellteilung, Zelltod, Interaktionen von Immunzellen oder infektiöser Agenzien können somit hochauflösend dargestellt werden (Asbury, 2011). Trotz des Erfolges konventioneller mikroskopischer Methoden, sind Limitationen in der chemischen Fixierung der Zellen oder Gewebe und der Bewertung biologischer Prozesse unter nicht - physiologischen Bedingungen zu sehen. Aussagen zu dynamischen Prozessen im zellulären bzw. organischen Kontext sowie die quantitative Datenerhebung durch wiederholende Untersuchungen können nicht realisiert werden (Massoud & Gambhir, 2003). *In vivo* - Untersuchungen mittels fluoreszenzmarkierter Proben revolutionierten zwar die Bildgebung, stellen aber trotzdem ein invasives Verfahren dar.

Zur nicht-invasiven Darstellung physiologischer und dynamischer Zusammenhänge finden Technologien der molekularen Bildgebung wie PET, SPECT oder MR Anwendung. Auf molekularer

Ebene werden Organismen repetitiv untersucht und quantitativ Daten erhoben. Drei- bzw. vierdimensionale Informationen (beinhaltet die zeitliche Komponente) können sehr viel schneller und einfacher gewonnen werden, verglichen mit konventionellen, invasiven, mikroskopischen Methoden. Auch vor dem ethischen Hintergrund der Reduktion von Tierzahlen stellt diese molekulare Bildgebungsmethode eine sehr innovative Technik dar. In Kombination mit der CT können außerdem makroskopische Bildinformationen zur Anatomie in die Daten- und Bildauswertung einbezogen werden.

Molekulare bildgebende Verfahren, auf invasiver oder nicht - invasiver Methodik basierend, finden je nach Fragestellung individuelle Anwendung. Allein oder in Kombination eingesetzt, verbessern diese Technologien das biologische Verständnis auf zellulärer Ebene und unterstützen die Darstellung physiologischer Zusammenhänge.

## 1.4 Zielstellung

Das Hühnerembryonenmodell ist ein etabliertes System, welches zur Studie diverser medizinischer und biologischer Fragestellungen angewendet wird. Unter anderem wird es zur Aufklärung infektionsbiologischer Prozesse eingesetzt. Neben viralen und fungalen Pathogenen werden auch Wirts – Pathogen - Interaktionen bakterieller Erreger, wie *Cp. psittaci* mit Hilfe dieses Modellsystems untersucht. Die erhobenen Daten beruhen jedoch alle auf molekularbiologischen, serologischen und zellkulturtechnischen Arbeiten und geben keine Möglichkeit den Infektionsverlauf *in ovo* darzustellen. Im Rahmen dieser Dissertation sollte daher das embryonierte Hühnerei als Modellsystem zur Charakterisierung der *Cp. psittaci* - Infektion eingesetzt sowie Wirts – Pathogen - Interaktionen mit Hilfe des nicht - invasiven, bildgebenden Verfahrens PET / CT untersucht und bewertet werden. Im ersten Teil der Arbeit stand die Einführung und Adaptierung des Modellsystems Hühnerei an das PET / CT - System im Vordergrund. Die Reduktion der entwicklungsbiologisch relevanten Mobilität der Embryonen stellt dabei die Voraussetzung zur artefaktfreien Datenerhebung *in ovo* dar. Das Überleben der anästhesierten Embryonen ist von zentraler Bedeutung und Voraussetzung für eine repetetive, quantitative Datenakquise. Geeignete Dosierungen der zur Langzeitanästhesie verwendeten Injektionsnarkotika Urethan /  $\alpha$  - Chloralose und Avertin sowie des Kurzzeitanästhetikum Isofluran sollten ermittelt werden.

Maßgebend für Erfolg versprechendes Arbeiten mit dem PET / CT ist die geeignete Applikation entsprechender Positronenemitter (Tracer). Die Etablierung einer zuverlässigen Route zur Applikation von Tracern während der Datenaufnahme ist vor allem für kinetische Fragestellungen (4D - Bildgebung) von eminenter Bedeutung. Der Fokus lag daher auf der Entwicklung eines geeigneten, reproduzierbaren Applikationssystems, welches die räumliche Einschränkung im PET - Scanner berücksichtigt.

Die bildliche Darstellung des Pathogens und dessen Interaktion mit dem Wirtssystem sollte im zweiten Teil der Arbeit herausgestellt werden. Initiale *in vitro* - Versuche mittels LigandTracer® - Technologie sollten die in der Literatur beschriebene, gesteigerte *in vitro* - Glukoseaufnahme in Folge einer Chlamydieninfektion durch Verwendung des Glukoseanalogons [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG untersuchen. Aufbauend auf der gesteigerten [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation *in vivo*, sollte die Übertragung auf das *in ovo* - System sowie die bildliche Darstellung der [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation in Folge der *Cp. psittaci* - Infektion mittels PET / CT erfolgen. *Hot spots* sollten nachstehend histologisch auf die Invasion von *Cp. psittaci* untersucht werden. Die Korrelation der über invasive, mikroskopische und nicht - invasive molekulare Bildgebung erhobenen Daten sollte dargestellt werden.

Neben der genannten indirekten Nachweisstrategie von *Cp. psittaci* mittels [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG, stand nachstehend der direkte Nachweis des Pathogens *in ovo* mittels PET / CT im Mittelpunkt der Untersuchungen. Aufbauend auf der Bindung bakterieller Antigene, sollte ein mit Zirkonium - 89 radioaktiv markierter anti – Chlamydia – LPS - Antikörper zur Detektion von *Cp. psittaci* eingesetzt werden.

Zusammenfassend betrachtet sollte im Rahmen dieser Arbeit die Anwendbarkeit des embryonierten Hühnereies als Modellsystem zur *in ovo* - Untersuchung chlamydialer Infektionen mittels PET / CT herausgestellt werden. Zudem sollte ein Beitrag zur bildlichen, 3-dimensionalen Darstellung der Wirts – Pathogen - Interaktion sowie Penetration des aviären Modells geleistet werden.

## 2. Material

### 2.1 Zelllinie und Chlamydienstamm

BGM	<i>Buffalo Green Monkey kidney cells</i> (Barron <i>et al.</i> , 1970)
<i>Chlamydophila psittaci</i> Stamm DC15	Isolat aus abortiertem Rinderfetus (Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen - Anhalt, Fachbereich Veterinärmedizin Stendal)

### 2.2 Hühnereier

*Gallus gallus domesticus*; Weiße Leghorn; Geflügel Bornitz GmbH

### 2.3 Medien

**Tab. 1: Puffer und Medien**

Puffer / Medium	Hersteller
Dulbecco's PBS (1 x) wo $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$	PAA
FBS Gibco® (Fetal Bovine Serum)	Invitrogen
DMEM High Glucose (4,5 g / l), with Glutamine	PAA
DMEM wo glucose; with Glutamine	PAA
Trypsin 0,5 % / EDTA 0,2 % (w / v) 10 x wo $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$	Biochrom

### 2.4 Lösungen und Puffer

**Tab. 2: Lösungen und deren Zusammensetzung**

Lösung	Zusammensetzung
Eiweißglycerin	Eiweiß von 3 Eiern steif schlagen und in Trichter mit Filterpapier geben; 1 Thymolkorn zugeben; 24 h bei +4 °C stehen lassen; Durchfluss abfüllen und 1 - 2 Tage im Kühlschrank stehen lassen; Filtrat 1:1 mit Glycerin mischen; Lagerung bei +4 °C



**Fortsetzung Tab. 2: Lösungen und deren Zusammensetzung**

Lösung	Zusammensetzung
HEPES (0,5 M)	18 ml Wasser zu 20 ml 1 M HEPES Lösung geben; pH einstellen (pH 7,1 - 7,3); Volumen auf 40 ml mit Wasser auffüllen
ITLC Eluent	0,42 g Zitronensäure (Monohydrat) in 100 ml Wasser (HPLC rein); Zugabe 0,98 ml Natriumcarbonat; pH einstellen (4,8 - 5,9)
Laufpuffer 10 x SDS - PAGE	30 g Tris, 144 g Glycin, 15 g SDS; auf 1 l auffüllen mit dH <sub>2</sub> O
NaCl 0,9 % / Gentissäure	0,5 g Gentissäure in 100 ml 0,9 % Saline; Zugabe von 0,88 ml 2,0 M Natriumcarbonat; mischen und pH einstellen (pH 4,9 – 5,3)
PBS (1 x)	3,7 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O; 0,43 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 7,2 g NaCl mit <i>Aqua dest.</i> auf 1 L
Proben – Lade - Puffer (Lämmli)	19,7 g Tris HCl (pH6,8), 40 g SDS, 100 ml Glycerin (≥ 99,5 % (v / v)), 0,006 % Bromphenolblau, 18 ml Mercaptoethanol, auf 1 l auffüllen mit dH <sub>2</sub> O
Sammelgel (3,75 %)	0,3 ml PAA (30 %); 1,5 ml dH <sub>2</sub> O; 0,6 ml Sammelgelpuffer; 2,5 µl TEMED; 12,5 µl APS (10 %)
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris - Cl; pH 6,8; 0,4 % SDS
SPGA - Stabilisator (Konservierungsmedium <i>Cp. psittaci</i> )	74,60 g Saccharose; 0,52 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,92 g L-Glutaminsäure; 1 % FBS
Trenngel (8 %)	4,25 ml PAA (30 %); 7,638 ml dH <sub>2</sub> O; 4 ml Trenngelpuffer; 16 µl TEMED; 96 µl APS (10 %)
Trenngelpuffer	1,5 M Tris - Cl, pH 8,9; 0,4 % SDS

## 2.5 Chemikalien

**Tab. 3: Chemikalien / Radionuklide**

Chemikalie	Hersteller
[ <sup>18</sup> F] - Fluorid; [ <sup>18</sup> F] - FDG	Eckert & Ziegler; FCON/ Zentralklinik Bad Berka GmbH
<sup>89</sup> Zr (Zirkonium - 89)	iba Pharma S.A.
2,2,2 - Tribromoethanol	Sigma - Aldrich
Aceton 100%	ROTH
Alpha – Chloralose (α – Chloralose)	Sigma - Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	Sigma - Aldrich
Bacillol®Plus	Bode
Brennspiritus (Ethylalkohol, 95 Vol. %)	ROTH
Braunoderm (50 % 2 - Propanol + 1 % Povidon - Iod)	BRAUN
Coomassie-Blau Roti®-Blue	ROTH
DAB-2-Komponentenentwicklerlösung	Dako
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Entellan® Eindeckmedium	Merck
Ethanol 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 96 %	ROTH
Gentissäure	Fluka
Hematoxylin ChemMate	Dako
HEPES Pufferlösung 1M	Invitrogen
Isofluran	Delta Select
Isopropanol	ROTH
Kanadabalsam	Merck
Kryomatrix NEG 50™	Thermo Scientific
Methanol	ROTH
Natriumcarbonat (wasserfrei)	Sigma - Aldrich
Optal	ROTH
SCN – Bz - Df	
[1-(4-Isothiocyanatophenyl)-3-[6,17-dihydroxy-7,10,18,21-tetraoxo-27-[N-acetylhydroxylamino)-6,11,17,22-tetraazaheptaicosane]thiourea/ Deferroxamine-p-SCN]	Macrocyclics
Paraffinplättchen Granopent® “P”	ROTH
PD Mini Trap G25 Desalting Columns	GE Healthcare
Polyacrylamid (PAA) 30 %	Sigma - Aldrich
Saline (0,9 %)	Braun

**Fortsetzung Tab. 3: Chemikalien / Radionuklide**

Chemikalie	Hersteller
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma - Aldrich
Tert – Amyl - Alkohol	Sigma - Aldrich
Urethan	Sigma - Aldrich
Xylol	ROTH

**2.6 Größenstandard**

*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas)

**2.7 Antikörper**

Mouse Anti – Chlamydia - LPS; monoklonal; MCA2718 AbD Serotec

Mouse Anti – Chlamydia - LPS; monoklonal; BDI168 Santa Cruz

Goat Anti – Mouse – Immunoglobulin / HRP konjugiert; polyklonal; ZHRP Dako

**2.8 Kit**

IMAGEN™Chlamydia; OXOID

**2.9 Geräte****Tab. 4: Geräte**

Gerät	Hersteller
Anästhesie - Kammer <i>combi-vet®</i>	Rothacher Medical GmbH
Bohrer <i>MultiPro® 395</i> (10000-33000 rpm)	Dremel
Bohreraufsatz <i>7103 Diamant</i>	Dremel
Bohrlochmessplatz <i>ISOMED 2100</i>	Nuklear Medizintechnik Dresden
Brutschrank <i>Hera Cell 150</i>	Heraeus
Brutgerät	Grumbach BSS300
Digitalthermometer <i>TFN 520</i>	ebro
Durchleuchtungslampe (Typ: Tempo Nr. 119)	ORBAN
Feinwaage <i>AC 211 S</i>	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop <i>BX5</i>	Olympus
(UV Brenner <i>U-RFL-T</i> , Kamera <i>PD50</i> )	ZEISS
Gefriermikrotom <i>HYRAX C60</i>	ZEISS

**Fortsetzung Tab. 4: Geräte**

Gerät	Hersteller
Gelelektrophoreseapparatur, horizontal	BioRad
Infrarotlichtlampe <i>IR 812</i>	Efbe - Schott
Labor PH-Meter <i>PH 315 I Set</i>	WTW
Laminar Flow <i>Hera Safe</i>	Thermo Scientific
Lichtmikroskop <i>Axiovert 25</i>	ZEISS
LigandTracer®White	RIDGEVIEW instruments
Magnetrührer/ Heizplatte IKAMAG® RCT	Janke & Kunkel
Micro – PET / CT Scanner	Siemens Medical Solutions
Peleusball	ROTH
Pipettierhilfe <i>accujet®</i>	BRAND
Präpariernadel mit Plastikgriff	ROTH
Sektionsbesteck (Scheren, Pipetten)	ROTH
Spiritusbrenner	ROTH
Stickstofftank <i>LS750</i>	TAYLOR-WHARTON
Ultraschallbad <i>Super RK 103H</i>	Sonorex
Vaporisator <i>Isotec 4</i>	Ohmeda
Vaporisator <i>Isoflurane Vapor 19.3</i>	Dräger
Wasserbad <i>GFL</i>	Julabo
Zählkammer Zellkultur <i>Neubauer improved</i>	Marienfeld
Zentrifuge <i>5702R</i>	Eppendorf
Zentrifuge <i>MIKRO 220R</i>	Hettich
Zentrifuge <i>ROTANTA 460 RS</i>	Hettich

## 2.10 Verbrauchsmaterialien

**Tab. 5: Verbrauchsmaterialien**

Material	Hersteller
Coverslipröhrchen	STERILIN
Deckgläser (24 x 50 mm)	ROTH
Eppendorf - Tube (1,7 ml)	ROTH
Eppendorf - Tube (2 ml)	ROTH
Einmalspritzen <i>Inject® - F</i>	BRAUN
Kanüle 27 G x 3 / 4“ (0,4 x 20 mm); <i>Sterican®</i>	BRAUN
Kanüle 30 G x 1 / 2“ (0,3 x 12 mm); <i>Fine - Ject®</i>	Henke Sass Wolf
Klebestreifen	Thesa

**Fortsetzung Tab. 5: Verbrauchsmaterialien**

Material	Hersteller
Kombi-Stopfen	Fresenius Kabi
Objektträger <i>MENZEL - Gläser</i> , Mattrand	Thermo Scientific
Objektträger <i>MENZEL - Gläser Superfrost</i>	Thermo Scientific
Pipettenspritzen gestopft (10 µl, 100 µl; 1000 µl)	Star Lab
Polyethylenschlauch <i>PORTEX® Fine Bore</i> (ø außen = 0,61 mm; ø innen = 0,28 mm)	Smiths Medical Interneational Ltd.
Spritzenfilter, steril (0,22 µm) <i>Rotilabo®</i>	ROTH
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	BD Falcon™
Zellschaber <i>S</i> 24 cm	TPP
Petrischale <i>TC Dish 92 x 17</i>	Nunc

**2.11 Software**

*Cell-D* (Fluoreszenzmikroskop)

Excel 2007

LigandTracer® Software 1.0.2

Trace Drawer 1.1

Inveon™ Software Siemens (Inveon Acquisition Workplace 1.5, microQ)

Word 2003

### 3. Methoden

#### 3.1. Zellbiologische Methoden

##### 3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

**Zelllinie, Medium und Supplemente:** In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich BGM - Zellen verwendet. Für deren Standardkultivierung wurde DMEM – Medium mit 2 mM L - Glutamin, supplementiert mit 10 % FKS, eingesetzt.

**Kulturbedingungen:** Die Zellen wurden im Brutschrank bei 90 % Luftfeuchtigkeit, +37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Plastikflaschen (T25; T75) kultiviert und regelmäßig bei annäherndem Erreichen der Konfluenz passagiert. Nach Absaugen des Mediums aus der Kulturflasche wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS – Puffer mit Trypsin (0,05 % (m / v)) – EDTA (0,02 % (m / v)) – Lösung für 5 min bei +37 °C inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurde die Trypsinaktivität mittels Kulturmedium gestoppt und für 5 min bei 1200 x g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen und in gewünschter Weise in neue Kulturgefäße überführt.

**Kryokonservierung und Auftauen von Zellen:** Zur Konservierung von Zellen wurden diese zunächst wie oben beschrieben kultiviert, geerntet und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in DMEM - Medium mit 10 % FKS, 2 mM L - Glutamin und 10 % DMSO aufgenommen und eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen / ml eingestellt. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in sterile Kryoröhrchen überführt. Diese wurden für zwei Stunden in einem mit Isopropanol gefüllten und auf +4 °C gekühlten Behälter inkubiert, bevor sie anschließend bei –80 °C gelagert wurden. Zum Auftauen einer Zellkonserve wurde diese kurz im +37 °C Wasserbad erwärmt und mit dem äquivalenten Volumen an frischem Kulturmedium in einem Zentrifugenröhrchen gemischt. Nach einer 5 - minütigen Zentrifugation bei 1200 x g wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen, auf die Kulturgefäße (T25; T75) verteilt und das entsprechende Volumen an Medium hinzugegeben.

##### 3.1.2 Kultivierung von *Cp. psittaci*

Alle nachstehenden Arbeiten wurden nach den Sicherheitsmaßnahmen der Stufe L2 durchgeführt.

**Infektion von Zellkulturen:** Die in T75 – Kulturflaschen, konfluent gewachsenen BGM – Zellen wurden mit circa 13 ml Infektionsmedium (DMEM; 2 mM L - Glutamin; 1 % FKS) überschichtet und mit  $1 - 2 \times 10^8$  einschlussbildenden Einheiten (EBE) infiziert. Die Kulturgefäße wurden für circa 48 Stunden bei +37 °C im Brutschrank gelagert.

**Ernte und Kryokonservierung:** Der Infektionsstatus der BGM – Zellen wurde zunächst lichtmikroskopisch kontrolliert. Nach der Beurteilung des Zellrasens wurde das Infektionsmedium

vorsichtig abgesaugt und der Zellrasen mit Hilfe eines Zellschabers in SPGA – Konservierungsmedium geerntet. Die Chlamydien – Zell - Suspension wurde auf Kryoröhrchen verteilt und bei –80 °C gelagert.

**Immunfluoreszenz:** Die Beurteilung des Infektionsstatus bzw. die Bestimmung des Gehalts an Chlamydien in einer Konserve erfolgte mittels immunfluoreszenzmikroskopischem Nachweis. Dazu wurden parallel zur Zellkulturflasche auch Deckglasröhrchen infiziert. Die auf den Deckgläschen infizierten Zellen wurden zum jeweiligen Zeitpunkt für 10 min mit Methanol fixiert und anschließend mittels IMAGEN™Chlamydia - Kit, nach Angaben des Herstellers, gefärbt. Der anti – LPS – *Chlamydiaceae* - spezifische Antikörper (FITC - gekoppelt) stellt die chlamydialen Einschlüsse dar, wohingegen die BGM - Zellen selbst durch *Evans Blue* - Markierung unterschieden werden konnten. Die Auswertung der Präparate erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

**Titerbestimmung:** Die Titerbestimmung erfolgte 6 – 8 Wochen nach der Kryokonservierung und Lagerung bei –80 °C. Dazu wurden BGM – Zellen in Zellkulturöhrchen mit Deckglas eingesät und die Ausbildung eines geschlossenen Zellrasens sichergestellt. Die Chlamydienkonserve wurde nach dem Schema in Tabelle 6 mit 1 x PBS – Puffer verdünnt:

**Tab. 6: Verdünnungsstufen zur Titerbestimmung von *Cp. psittaci***

Röhrchennummer	PBS – Vorlage	Inokulum	Verdünnungsstufe
1	10 ml	10 µl Originalsuspension	10 <sup>-3</sup>
2	0,9 ml	100 µl aus Röhrchen 1	10 <sup>-4</sup>
3	0,9 ml	100 µl aus Röhrchen 2	10 <sup>-5</sup>
4	0,9 ml	100 µl aus Röhrchen 3	10 <sup>-6</sup>

Das Zellkulturmedium wurde aus den Röhrchen abgesaugt und 200 µl aus einer der in Tabelle 6 aufgeführten Verdünnungsstufen hinzugegeben. Pro Verdünnung wurden parallel zwei Röhrchen beimpft, um die Auswertung mittels Immunfluoreszenz gegebenenfalls zu verschiedenen Zeitpunkten durchzuführen. Die Röhrchen mit den infizierten Zellen wurden eine Stunde bei +37 °C und 3400 x g in einer aerosoldichten Zentrifuge mit ausschwingendem Rotor zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand im Röhrchen abgesaugt, 1 ml Infektionsmedium zugegeben und bei +37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank für 48 Stunden inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mittels IMAGEN™Chlamydia - Kit gefärbt. Bei geeigneter Verdünnungsstufe und Vergrößerung wurden mit einem Lichtmikroskop 20 Gesichtsfelder ausgezählt und der Chlamydientiter nach folgender Formel bestimmt:

**Formel 1: Berechnung des *Cp. psittaci* - Titters einer Kryokonserve**

EBE / ml = X x Flächenfaktor x Verdünnungsstufe	X: Anzahl Einschlusskörper
	Flächenfaktor 20 x Vergrößerung: 540
	Flächenfaktor 40 x Vergrößerung: 2146

### 3.2. Methoden zum Umgang mit embryonierten Hühnereiern

Soweit nicht anderes angegeben, basieren die angewandten Methoden, gegebenenfalls modifiziert, auf den Veröffentlichungen von Burley & Vadehra (1989), Mayr *et al* (1974) sowie Brake *et al.* (1997).

#### 3.2.1 Herkunft und Bebrütung der Hühnereier

Befruchtete Hühnereier (Gewicht  $60 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$ ; *Gallus gallus domesticus*; Weiße Leghorn; Geflügel Bornitz GmbH) wurden in horizontaler Lage im Brutschrank mit Ventilationssystem und automatischer Wendevorrichtung bei  $+37,7 \text{ °C} \pm 0,2 \text{ °C}$  und einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $60 \% \pm 2 \%$  inkubiert. Ein Fertilitätsdurchschnitt von 80 – 90 % wird garantiert. Nicht sofort inkubierte Eier wurden im Kühlschrank bei  $+7 \text{ °C}$  gelagert, wobei die Lagerdauer ein Maximum von sieben Tagen nicht übersteigen sollte. Ab dem vierten Inkubationstag wurden die Eier vier Mal täglich automatisch um  $360^\circ$  gewendet. Die Eier wurden täglich durchleuchtet („schieren“) und unbefruchtete Eier bzw. abgestorbene Embryonen entsorgt.

#### 3.2.2. Absenkung der CAM

Am zehnten Inkubationstag wurden die Eier durchleuchtet und die Position des Embryos sowie der Luftblase am stumpfen Eipol markiert. Des weiteren wurde eine etwa in der Mitte des Eies, gut entwickelte Stelle der CAM auf der Eischale markiert. Unterhalb dieser Markierung sollten keine Blutgefäße verlaufen, die bei der späteren Öffnung verletzt werden könnten. Die Eischale wurde anschließend mit Braunoderm® desinfiziert und mit dem Bohrer (Drehmel) an den beiden vorgesehenen Stellen (Luftblase und CAM) ein jeweils 2,5 mm großes Loch gebohrt. Mit Hilfe eines Metallstäbchens wurde die Schalenhaut perforiert ohne dabei die CAM zu durchstechen. Vom stumpfen Eipol her wurde mit einem Peleusball aspiriert. Durch den sich ausgleichenden Unterdruck im Inneren des Eies senkte sich die CAM ab. Die Größe der sich neu bildenden artifiziellen Luftblase konnte durch unterschiedlich starkes Saugen beeinflusst und parallel mit der Durchleuchtungslampe kontrolliert werden. Die Öffnungen der Eischale wurden anschließend mit Hilfe von erhitztem Paraffin (Schmelzpunkt  $+60 \text{ °C}$ ) vorsichtig verschlossen. Die Eier wurden in horizontaler Lage ohne Wendeautomatik, um das Ablösen des Paraffins zu verhindern, weiter bebrütet.

#### 3.2.3. Inokulation der Hühnerembryonen mit *Cp. psittaci*

Die Embryonen wurden stets am zehnten Inkubationstag mit  $5 \times 10^4$  einschlussbildenden Einheiten (EBE) von *Cp. psittaci* DC15 infiziert. Die verwendete Infektionsdosis basiert auf Versuchen des Friedrich – Löffler - Instituts Jena. Eine *Cp. psittaci* Konserve wurde aufgetaut und eine entsprechende Verdünnung in 1 x PBS - Puffer hergestellt. Für die Inokulation wurde die mit Paraffin verschlossene Öffnung oberhalb der neu generierten Luftkammer (siehe Kapitel 3.2.2.) vorsichtig mit einem Metallstäbchen geöffnet bzw. nach dem Absenken der CAM direkt inokuliert.



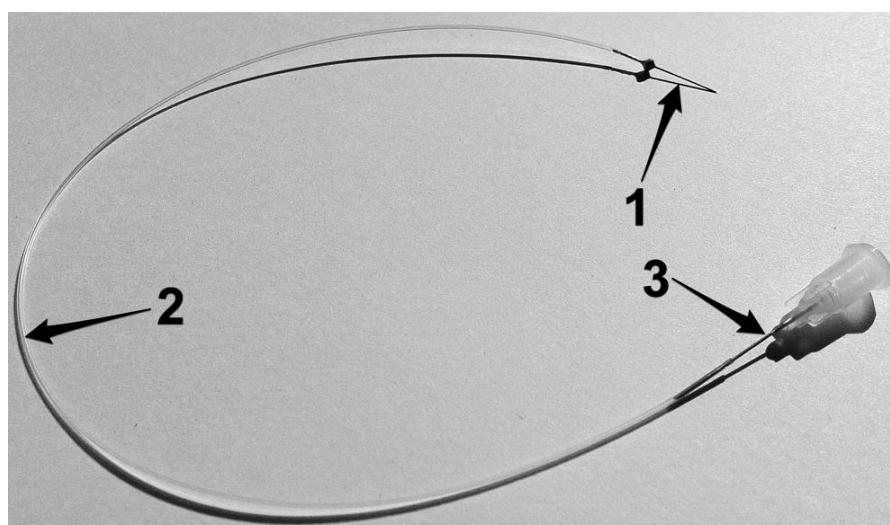
Das entsprechende Volumen der *Cp. psittaci* - Suspension wurde mit einer Pipette durch das gebohrte Loch auf die abgesenkte CAM aufgegeben. Die für Kontrollexperimente eingesetzten embryonierten Hühnereier erhielten das gleiche Volumen an reinem PBS. Anschließend wurde die Inokulationsstelle mit Paraffin verschlossen und erneut desinfiziert. Die Eier wurden in horizontaler Position ohne Wendung weiter bebrütet. Das Überleben der Embryonen wurde durch tägliches Schieren überprüft.

### 3.2.4. Präparation von Hühnerembryonen

Für die Präparation der Embryonen wurden diese zuvor circa 30 min auf Eis gelagert bzw. im anästhesierten Zustand im Anschluss an eine PET / CT - Messung direkt präpariert. Dazu wurde das Ei am stumpfen Eipol mit einer sterilen Schere geöffnet und der Embryo entnommen. Nachfolgend wurden die den Embryo umgebende Häute sowie der Dottersack entfernt. Mit sterilem Sektionsbesteck wurde der Bauchraum des Embryos geöffnet und Leber sowie Milz entnommen. Die Organe wurden in kleine Blöcke geschnitten, auf Alufolie gelegt und direkt in flüssigen Stickstoff überführt. Die Gewebeprobe wurde in ein Kryoröhrchen, in welches in Boden und Deckel eine Öffnung eingebracht wurde, überführt und in einem Stickstofftank bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.2.5. Herstellung Kathetersystem für intravaskuläre Applikation

Der verwendete Katheter wurde aus 30 G- und 27 G – Nadeln sowie circa 20 cm Polyethylenschlauch (Abb. 5, Pfeil 2) hergestellt. Dazu wurde der Luer Lock – Anschluss der 30 G – Nadel durch Erhitzen entfernt und der stumpfe Teil der Nadel in den Schlauch eingebracht (Abb. 5; Pfeil 1). Am anderen Ende des Schlauches wurde eine 27 G – Nadel mit dem spitzen Ende in den Schlauch eingeführt (Abb. 5, Pfeil 3), ohne diesen dabei zu durchstechen.

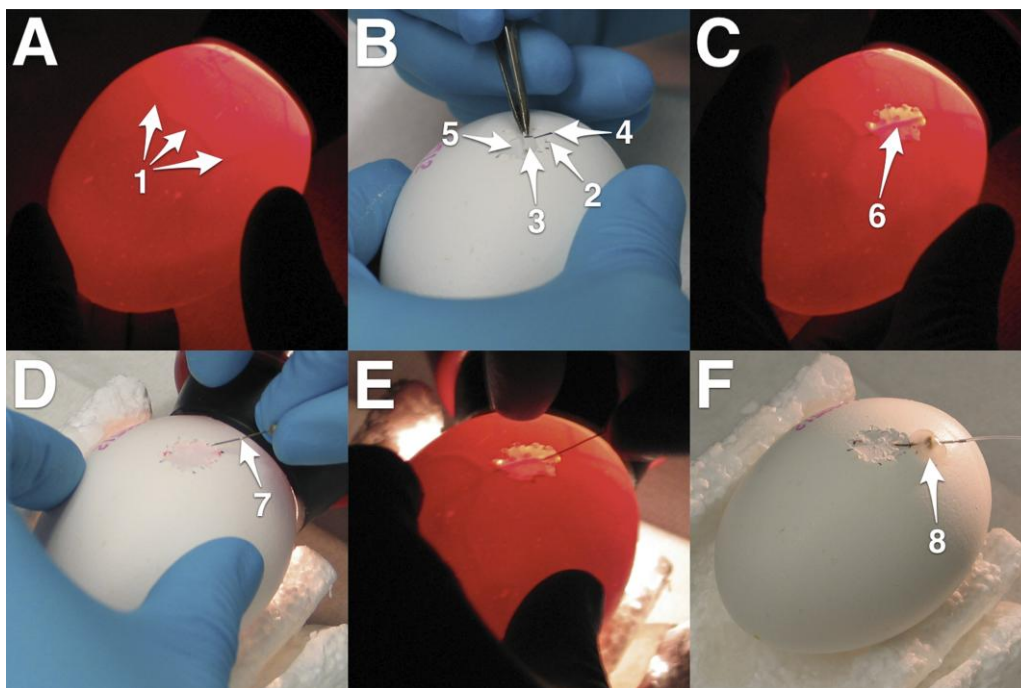


**Abb. 5: Aufbau des Katheters zur intravaskulären Applikation (Heidrich & Würbach et al., 2011)**

Die Durchlässigkeit und Unversehrtheit des Kathetersystems wurde kurz vor der Verwendung am Embryo kontrolliert, indem 1 x PBS (circa 300 µl) mit einer Spritze durch den Katheter gespült wurde. Dadurch wurde auch die im Schlauch befindliche Luft entfernt.

### 3.2.6. Intravaskuläre Applikation von Hühnerembryonen *in ovo*

Für die intravaskuläre Applikation wurden die Eier am entsprechenden Inkubationstag mit der Schierlampe durchleuchtet. Für die Punktion der CAM wurde der Verlauf eines Blutgefäßes der 2. oder 3. Ordnung auf der Eischale markiert (Abb. 6, Bild A, Pfeil 1). Im Bereich um das Gefäß, wurden mehrere Löcher gebohrt (Abb. 6, Bild B, Pfeile 2 - 5), die eine Fläche von circa 1 cm<sup>2</sup> umschlossen. Mit einer Pinzette wurde ausgehend von den Löchern die Eischale über dem Blutgefäß vorsichtig entfernt (Abb. 6, Bild B). Eier bei denen die CAM bzw. das Blutgefäß verletzt wurden, fanden keine Verwendung für die nachstehende Applikation (Abb. 6, Bild C, Pfeil 6). Während das Ei durchleuchtet wurde, erfolgte das Einführen des Katheters in das vorbereitete Blutgefäß der CAM (Abb. 6, Bild D, Pfeil 7; Bild E). Das Verrutschen des Katheters wurde verhindert, indem das Ende der Metallnadel (kurz vor dem Übergang zum Schlauch) mit Paraffin fixiert wurde (Abb. 6, Bild F, Pfeil 8). Die richtige Positionierung der Kathetersystems im Blutgefäß wurde durch die Applikation von 1 x PBS - Puffer überprüft. Die PBS - Spritze wurde danach entfernt und der Katheter mittels Kombi - Stopfen verschlossen. Die vorbereiteten Eier wurden bis zur Verwendung im Brutschrank bei +37 °C ohne Wendung gelagert.



**Abb. 6: Vorbereitung der Eier zur intravaskulären Applikation (Heidrich & Würbach *et al.*, 2011)**

Durchleuchten des Eies und Kennzeichnung des Blutgefäßes (A); Entfernung der Eischale (B); Kontrolle des Blutgefäßes (C); Einführung des Katheters (D); Kontrolle mittels Durchleuchten beim Einführen des Katheters (E); Fixierung des Katheters mit Paraffin (F).

### 3.3. Anästhesie von Hühnerembryonen

Eine Voraussetzung für die *in ovo* - Untersuchung von lebenden Hühnerembryonen mittels PET / CT ist die artefaktfreie Datengewinnung durch Anästhesie. In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Narkotika, deren anästhetische Wirkung sowie das Überleben der Embryonen von Inkubationstag 10 bis 18 untersucht. Es wurden jeweils drei Eier pro Narkotikum und Inkubationstag sowie jeweils ein Kontrollei verwendet.

#### 3.3.1. Anästhesie mittels Urethan und Alpha - Chloralose (UC)

Das UC-Narkotikum wurde als eine Mischung aus 450 mg / ml Urethan und 45 mg / ml Alpha ( $\alpha$ ) - Chloralose hergestellt (Sugiyama *et al.*, 1996). Die Substanzen wurden in sterilem Wasser aufgenommen, für circa 15 min im Ultraschallbad bei +30 °C gelöst und sofort verwendet. Das UC - Narkotikum wurde direkt auf die abgesenkte CAM (Kapitel 3.2.2.) appliziert und die dazu gebohrten Löcher der Eischale anschließend mit Paraffin verschlossen. Die verwendeten Dosierungen sind in Kapitel 4.1.2.1 dargestellt. Bis zum Eintreten der Wirkung des Narkotikums wurden die Eier für 15 min im Inkubator bei +37 °C ohne Wendung gelagert und nachfolgend im CT gemessen.

#### 3.3.2. Anästhesie mittels Avertin

Avertin wurde als Stocklösung (1600 mg / ml), bestehend aus 5 g 2,2,2 – Tribromoethanol, gelöst in 3,1 ml tert – Amyl – Alkohol hergestellt (Papaioannou & Fox, 1993). Diese wurde direkt in unverdünnter Form auf die abgesenkte CAM appliziert (Kapitel 3.2.2.) und die Eischale mit Paraffin verschlossen. Die verwendete Dosierung ist in Kapitel 4.1.2.2 dargestellt. Die Eier wurden bis zur Messung im CT bei +37 °C für 15 min im Inkubator ohne Wendung gelagert.

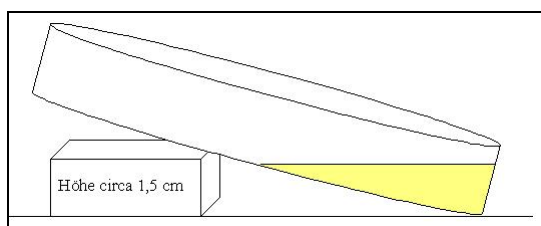
#### 3.3.3. Anästhesie mittels Isofluran

Isofluran wurde als gebrauchsfertige Lösung erworben, vaporisiert (Dräger Isoflurane Vapor) und als Sauerstoffgemisch eingesetzt. Für die Anästhesie wurde ein Zustrom von 5 Volumenprozent Isofluran bei einem Sauerstoffstrom von 0,6 Liter pro Minute gewählt. Vor dem Beginn der Anästhesie wurden die Eier durchleuchtet und für unterschiedliche Inkubationszeiten in eine Narkosekammer gelegt. Eine Infrarotlampe sicherte eine konstante Temperatur von +37 °C  $\pm$  2 °C auf der Oberfläche des Eies, welche mit Hilfe eines Digitalthermometers kontrolliert wurde. Die verwendeten Inkubationszeiten sind in Kapitel 4.1.2.3 dargestellt. Die embryonierten Eier wurden umgehend mittels CT gemessen.

### 3.4 LigandTracer®White - Technologie

Die LigandTracer® - Technologie ist eine semi – automatisierte Methode zur *in vitro* - Untersuchung von Bindungskinetiken in Echtzeit. Das System ist für Messungen radioaktiv markierter Verbindungen geeignet, welche mit Oberflächenproteinen oder Rezeptoren interagieren.

$1 \times 10^6$  BGM - Zellen wurden halbseitig, wie aus Abbildung 7 ersichtlich, auf eine Petrischale aufgebracht. Dazu wurden die Zellen wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben kultiviert, geerntet und in 5 ml Kulturmedium aufgenommen. Während dem Aussäen wurde die Petrischale an ein Objekt, mit einer Höhe von circa 1,5 cm, schräg angestellt und die Zellsuspension vorsichtig in den unteren Teil der Schale pipettiert (Abb. 7). Dieser Bereich wurde markiert und die Petrischale mit den Zellen für circa 8 Stunden in schräger Position im Brutschrank bei +37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

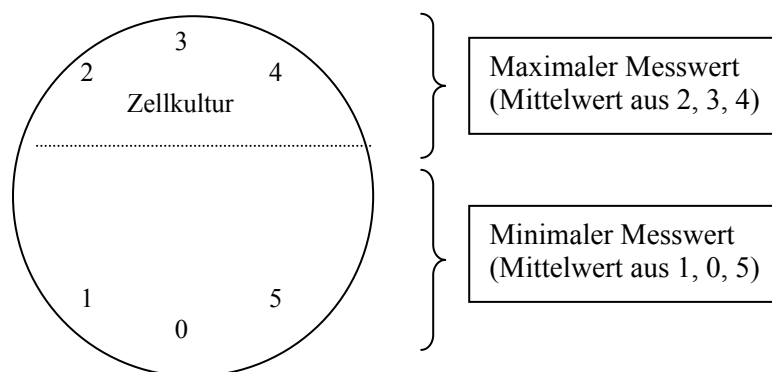


**Abb. 7: Halbseitiges adhären von Zellen auf einer Petrischale**

Nach dem adhären der Zellen wurde die Petrischale vorsichtig in horizontale Position gestellt, 10 ml frisches Kulturmedium hinzugegeben und über Nacht im Brutschrank bei +37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gelagert. Vor der Verwendung der Petrischalen für Messungen bzw. Infektionen mit *Cp. psittaci*, wurde mit Hilfe des Mikroskops sicher gestellt, dass sich die Zellen nur im vorgesehenen Bereich anlagerten. Petrischalen bei denen Zellen auch im nicht-markierten Bereich adhärert waren, fanden keine weitere Verwendung. Für Infektionsexperimente wurden die Zellen mit einer MOI von 0,0625 bis 2,0 mit *Cp. psittaci* infiziert und 24 Stunden im Brutschrank gelagert. Kontrollplatten wurden hingegen mit reinem Kulturmedium behandelt. Die Platten verblieben bis zur Verwendung im Inkubator. Vor Messbeginn wurden die Petrischalen zwei Mal mit je 5 ml vorgewärmten 1 x PBS – Puffer gewaschen. Es wurden 4 ml vorgewärmtes DMEM – Medium ohne Glukose zugegeben und die Petrischale in das Gerät eingesetzt. Die Messung erfolgte im *Uptake / Retention* – Modus bei folgenden Einstellungen:

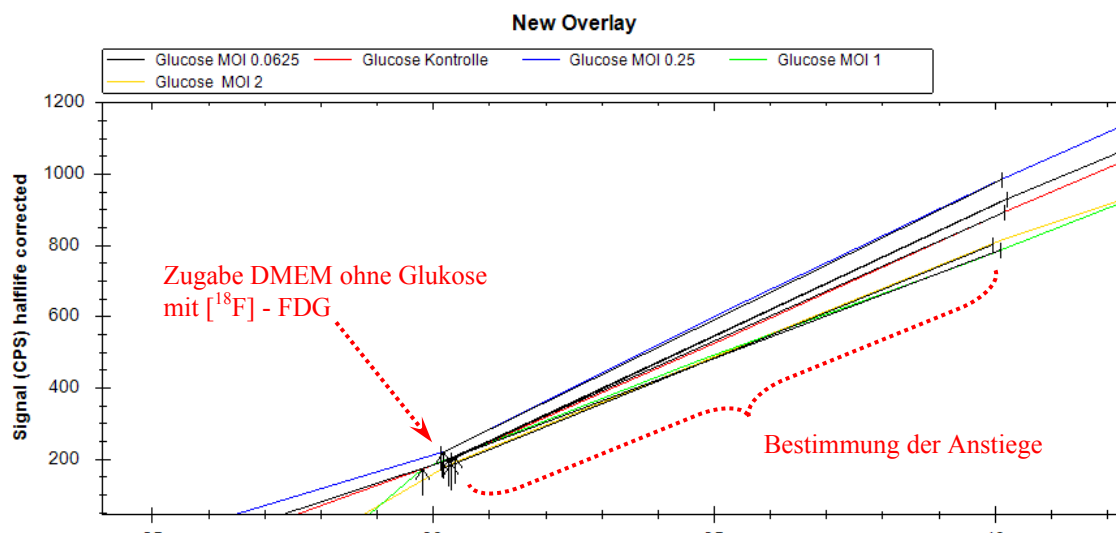
- Zeit des Experiments: Minuten
- Frequenz der Datensammlung: ein Datenpunkt / 5 Minuten
- Rotation: 3+3 (Messpunkte)
- Messdauer pro Messpunkt: 4 Sekunden
- Temperatur: + 37 °C

Im Anschluss an einen Vorlauf von 30 Minuten, wurde DMEM – Medium ohne Glukose und ohne Radionuklid, gegen 4 ml DMEM – Medium ohne Glukose mit ungefähr 0,5 MBq [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG (Bohrlochmessung direkt vor Zugabe) ersetzt. Messdaten wurden für weitere 30 Minuten erhoben. Die Einstellung der Messparameter erfolgte mit der LigandTracer® - Software 1.0.2. Die Auswertung der Daten, die Halbwertszeitkorrektur und die Diagrammdarstellung mit Trace Drawer 1.1. Die gewonnen Datenpunkte wurden aus dem maximalen Messwert, abzüglich des minimalen Messwertes aus einer Rotationsrunde kalkuliert (Max – Min - Blot). Der Maximal- bzw. Minimalwert ergibt sich bei einer 3+3 - Messeinstellung als Mittelwert aus zehn Messpunkten (Abb. 8).



**Abb. 8: Messpunkte des LigandTracer®-Systems zur Ermittlung der Daten eines Max-Min-Blots aus einer 3+3-Messeinstellung**

Die Aufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG durch die Zellen wurde als *counts per second* (cps) - Wert in einem Diagramm auf der Y - Achse gegen die Zeit (in Minuten) auf der X - Achse abgebildet (Abb. 9). Mit Hilfe der Software wurde der Anstieg der Kurven (*Slope*) ermittelt.



**Abb. 9:  $[^{18}\text{F}]$ -FDG-Akkumulation in *Cp. psittaci*-infizierten BGM-Zellen nach 24 Stunden im Vergleich zu nicht infizierten Zellen**

Die Zellen wurden mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0,0625, 0,25, 1 und 2 infiziert. Die Bestimmung der Anstiege erfolgte mit Hilfe der LigandTracer® - Software 10 min nach Tracerzugabe in einem linearen Kurvenbereich.

Um eine einheitliche und vergleichbare Auswertung von Kontroll- und Infektionsplatten zu ermöglichen, wurde der Anstieg der Aktivität pro Zeit (cps / min.) 10 min nach Zugabe des Tracers über einen linearen Kurvenbereich bestimmt (Abb. 9). Da sich eine exakte Konzentrationseinstellung des Tracers im DMEM - Medium vor Messbeginn nicht realisieren ließ, wurden die Anstiege nachstehend auf eine Aktivität von 0,5 MBq normiert. Der Korrekturfaktor K wurde wie folgt ermittelt:

#### Formel 2: Berechnung Korrekturfaktor K

$$K = 0,5 \text{ MBq} / X \quad (X = \text{applizierte Aktivität})$$

### 3.5 Antikörpermarkierung mit Zirkonium - 89

Das  $\beta^+$ -emittierende Radionuklid Zirkonium – 89 ( $^{89}\text{Zr}$ ) besitzt eine Halbwertszeit von 78,4 Stunden. Das Positron hat eine relativ niedrige Anfangsenergie (maximale kinetische Energie) von nur 0,9 MeV. Dies ist eine entscheidende Voraussetzung für die hohe räumliche Auflösung der PET - Bilder. Die Markierung eines anti – Chlamydia - LPS - Antikörper mit  $^{89}\text{Zr}$  basiert, bis auf genannte Abweichungen, auf Arbeiten von Perk *et al.* (2010).

### 3.5.1 Entsalzen und Umpuffern des Antikörpers

Vorbereitend für das *Labeling* mit  $^{89}\text{Zr}$  wurde der in Tris - Puffer (vom Hersteller) gelöste Antikörper zunächst einer doppelten Entsalzung und Umpufferung unterzogen. Dazu wurden 0,7 mg des Antikörpers auf eine mit 6,5 ml 0,9 % Saline konditionierte PD25 - Säule aufgegeben. Die Fraktion 1 wurde gesammelt. Fraktionen 2 und 3 wurden nachfolgend durch das Aufbringen von weiteren 50  $\mu\text{l}$  (entspricht F 2) bzw. 700  $\mu\text{l}$  (entspricht F 3) 0,9 % Saline gewonnen. Das Eluat aus F 3 (circa 690  $\mu\text{l}$ ) wurde in den zweiten Entsalzungsschritt mit einer neuen und ebenfalls mit 0,9 % Saline konditionierten PD25 - Säule überführt. Für Fraktion 2 wurden 60  $\mu\text{l}$  und für Fraktion 3 700  $\mu\text{l}$  0,9 % Saline auf die PD25 - Säule pipettiert.

Der eluierte Antikörper aus Fraktion 3 aus der zweiten Reinigung konnte mittels HPLC sowie im SDS - Gel nachgewiesen werden. Der pH - Wert wurde mit 0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  auf 8,9 – 9,1 eingestellt. 15  $\mu\text{l}$  einer 5 mM Desferrioxamin – p – SCN - Lösung (SCN – Bz – Df) in DMSO wurden tropfenweise zum gereinigten Antikörper gegeben. Das Gemisch wurde für 60 min bei +37 °C unter stetigem Rühren inkubiert und anschließend auf eine mit 0,9 % NaCl / Gentissäure (5 mg / ml; pH 4,9 – 5,3) – konditionierte PD25 - Säule gegeben. Der Durchfluss wurde verworfen (F 1) und 60  $\mu\text{l}$  der NaCl / Gentissäure – Lösung auf die Säule gegeben (F 2). Der Antikörper wurde anschließend durch Zugabe von 700  $\mu\text{l}$  NaCl / Gentissäure eluiert.

### 3.5.2 Antikörperlabeling mit $^{89}\text{Zr}$

Maximal 200  $\mu\text{l}$  [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr - Oxalat (37 – 185 MBq) wurden in ein zuvor mit 1 M Oxalsäure ausgespülten und im Ultraschallbad gereinigten Glasreaktionsgefäß gegeben. Unter Rühren wurde das eingesetzte Volumen  $^{89}\text{Zr}$  auf 200  $\mu\text{l}$  mit 1 M Oxalsäure aufgefüllt und 90  $\mu\text{l}$  2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  zugegeben. Das Gemisch wurde für 3 min unter Rühren inkubiert und anschließend 300  $\mu\text{l}$  0,5 M Hepes (pH 7,2) zugegeben. Der gereinigte und chelatkomplexierte Antikörper (Kapitel 3.5.1) wurde zur  $^{89}\text{Zr}$  – Lösung in das Glasgefäß überführt, 700  $\mu\text{l}$  0,5 M Hepes zugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aufreinigung des markierten Antikörpers erfolgte über eine mit 0,9 % NaCl / Gentissäure konditionierte PD25 - Säule. Dazu wurde der gesamte Reaktionsansatz (690  $\mu\text{l}$ ) auf die Säule pipettiert und mit 60  $\mu\text{l}$  (entspricht F 2) bzw. 700  $\mu\text{l}$  (entspricht F 3) 0,9 % NaCl / Gentissäure eluiert. Die Effizienz der radioaktiven Markierung wurde mittels HPLC sowie zusätzlich mittels Dünnschichtchromatographie beurteilt (Kapitel 3.5.3).

### 3.5.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Beurteilung der  $^{89}\text{Zr}$  - Markierung des anti – Chlamydia - LPS - Antikörpers wurden je 2  $\mu\text{l}$  des markierten Antikörpers sowie reines  $^{89}\text{Zr}$  auf eine Silikagel – Membran aufgetragen. Die Membran wurde in eine mit Zitronensäure (pH 4,8 – 5,0), welche als Laufmittel diente, gefüllte Kammer eingestellt. Anschließend wurde die Membran in Streifen geschnitten und getrocknet. Der Startbereich sowie die Lauffront der aufgetragenen Proben wurden am Bohrloch gemessen (in cps).

Der Markierungsversuch galt als gelungen, wenn der markierte Antikörper unter diesen Bedingungen einen Rf - Wert von 0,0 – 0,1 aufwies und mehr als 80 % der Gesamtaktivität ausmachte. Unkomplexiertes  $^{89}\text{Zr}$  hatte einen Rf - Wert von 0,4 – 1,0. Zusätzlich wurde mit Radio - HPLC analysiert.

### 3.5.4 SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - Page)

Zur Analyse der Antikörperfraktionen wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid (SDS) - Gelelektrophorese, wie durch Laemmli (1970) beschrieben, durchgeführt. Vor dem Auftragen der jeweiligen Fraktionen auf das Gel wurden diese in 4 x Laemmli - Puffer für 5 min bei + 95 °C denaturiert. Die Proben wurden auf einem 8 % - igem Gel unter diskontinuierlichen Pufferbedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Zum Einwandern der Proteine in das Gel wurde zunächst eine Spannung von 50 mA angelegt. Die Auftrennung erfolgte bei 80 mA. Als Größenmarker wurde der *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* eingesetzt. Zur Darstellung des Antikörpers wurde das Gel anschließend mit Roti®Blue Kolloidal Coomassie - Lösung gefärbt.

## 3.6 Immunhistochemie

### 3.6.1 Herstellung von Kryostatschnitten und Acetonfixierung

Zur mikroskopischen Beurteilung der Invasivität von *Cp. psittaci* wurden Milz und Leber wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben entnommen und bis zur Aufarbeitung im Stickstofftank gelagert. Die Temperatur der Proben wurde nach der Entnahme aus dem Tank zunächst für circa 30 min auf -20 °C (im Kryostat) angeglichen. Das Organ wurde mittels Kryomatrix auf einer Metallscheibe fixiert und vor dem Messer eingespannt. Nach Erreichen der gewünschten Schnittposition und -tiefe wurde das Gewebe 7 µm dünn geschnitten und auf mit Eiweißglycerin bestrichene Objektträger aufgezogen. Die Objektträger mit dem Gewebe wurden für circa 24 Stunden getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte für 30 sec in Aceton eingestellt und für 15 – 30 min luftgetrocknet. Die Objektträger wurden in Alufolie verpackt bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### 3.6.2 Peroxidase – Anti – Peroxidase (PAP) – Technik

Die immunhistochemische Färbung mittels PAP – Methode dient der Sichtbarmachung chlamydialer Antigenstrukturen im gefriergeschnittenen Gewebe. Zur besseren Darstellung der Zellmorphologie werden die Kerne mit einer zum Chromogen (Diaminobenzidin = braun) kontrastierenden Farbe gegengefärbt (Hämalaun = blau).

Die Gewebeschnitte wurden aus -20 °C entnommen (Kapitel 3.6.1) und circa 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach einer 10 - minütigen Fixierung in 100 % Aceton wurden diese für 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Pro Objektträger wurden 200 µl des in 1 x PBS - Puffer



verdünnten (1:200) primären, *Chlamydiaceae* - spezifischen, monoklonalen Antikörpers pipettiert und verteilt. Als Negativkontrolle wurden adäquate Gefrierschnitte anstelle des primären, monoklonalen Antikörpers lediglich mit 1 x PBS - Puffer behandelt. Nach einer 30 - minütigen Inkubationszeit in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur wurden die Objektträger zwei Mal in 1 x PBS - Puffer gespült. Der HRP – konjugierte, sekundäre Antikörper (Ziege – anti – Maus) wurde 1:100 mit 1 x PBS und 25 % Hühnerserum verdünnt, wovon 200 µl pro Objektträger aufgetragen und verteilt wurden. Eine erneute Inkubation von 30 min in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur und ein zweimaliges Waschen mit 1 x PBS folgte. Pro Objektträger wurden 100 µl Entwicklerlösung (Diaminobenzidin = DAB) aufgetragen, 5 min inkubiert und ein Mal mit 1 x PBS gespült. Die Entwicklung wurde anschließend durch Einstellen der Schnitte in eine mit *Aqua dest.* gefüllte Glasküvette gestoppt und 1 min durch Zugabe von Hematoxylin (250 ml pro Objektträger) gegengefärbt. Die Objektträger wurden danach in *Aqua dest.* geschwenkt, 5 min in Leitungswasser gebläut und erneut in *Aqua dest.* gespült. Die Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Kapitel 3.6.3) entwässert und mit Kanadabalsam eingedeckt.

### 3.6.3 Entwässern mittels aufsteigender Alkoholreihe

Zum Eindecken der Schnitte mit nicht wasserlöslichem Kanadabalsam müssen die Präparate zunächst mittels aufsteigender Alkoholreihe (50%, 60%, 70%, 80%, 96% Ethanol für je 2 min; Optal I, Optal II für je 2 min) entwässert und danach mit dem im Eindeckmedium vorkommenden Lösungsmittel Xylol (Xylol I; Xylol II; Xylol III für je 2 min) behandelt werden.

### 3.6.4 Quantifizierung der Invasivität von *Cp. psittaci*

Zur Untersuchung der Invasivität von *Cp. psittaci* im Hühnerembryo wurden Leber und Milz entnommen, Kryoschnitte angefertigt und eine PAP – Färbung zur Darstellung der chlamydialen Antigene durchgeführt (Kapitel 3.6.1; 3.6.2, 3.6.3). Zur Quantifizierung wurden die Schnitte mit dem Lichtmikroskop (*Axiovert 25*; ZEISS) in 40 - facher Vergrößerung betrachtet und Chlamydien - koloniebildende Einheiten in insgesamt 40 Gesichtsfeldern pro Organ ausgezählt. Von einem untersuchten Organ wurden mindestens 4 Kryoschnitte auf einen Objektträger aufgebracht. Dadurch war es möglich pro Schnittebene eines Organs 10 Blickfelder auszuzählen. Die jeweils anderen 10 Blickfelder wurden in einer anderen Schnittebene der gleichen Organprobe betrachtet.

### 3.7 Positronenemissionstomographie/Computertomographie (PET / CT)

Die funktionale Bildgebung *in ovo* erfolgte mit einem Siemens Inveon micro – PET / CT - Scanner für Kleintiere. Der Versuchsablauf und -aufbau ist nachstehend beschrieben.

#### 3.7.1 Vorbereitung der Hühnereier für die PET / CT – Messung

Die embryonierten Hühnereier des entsprechenden Entwicklungstages wurden vor Messbeginn durchleuchtet, gewogen und ein Katheter, wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, in ein Blutgefäß der CAM eingebracht. Die Anästhesie erfolgte wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben mit Isofluran. Innerhalb einer Messung konnten parallel zwei narkotisierte Eier auf das Bett des micro – PET / CT - Scanners aufgebracht werden. Ohne den Schlauch des Katheters abzuklemmen, wurden die Eier mit Hilfe von Klebestreifen fixiert.

#### 3.7.2 Optimierung der Isofluran - Narkose für die PET / CT – Messung

Um die Anästhesie der Embryonen während der gesamten Messdauer von CT (20 min) und PET (1 h) aufrechtzuerhalten, wurde die Optimierung der Isofluran - Narkose notwendig. Die Eier wurden zunächst wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben in der Narkosekammer für circa 15 min sediert. Für die PET / CT - Messung wurde das Ei in einer verschließbaren Plastiktüte, welche mit einem *combi-vet*® Anästhesiesystem verbunden war, auf dem Bett fixiert. Das Ende des Katheters zur Tracerapplikation, wurde aus der Öffnung der Tüte geführt und ebenfalls auf dem Bett fixiert. Eine kontinuierliche Zufuhr von 1,5 % Isofluran, gemischt mit reinem Sauerstoff und einer Durchflussrate von 1 L / min, wurde sicher gestellt. Der Scanner wird ständig abgesaugt (Schlauch zur Raumabluft).

#### 3.7.3 CT - Messung, Applikation des Tracer und PET - Messung

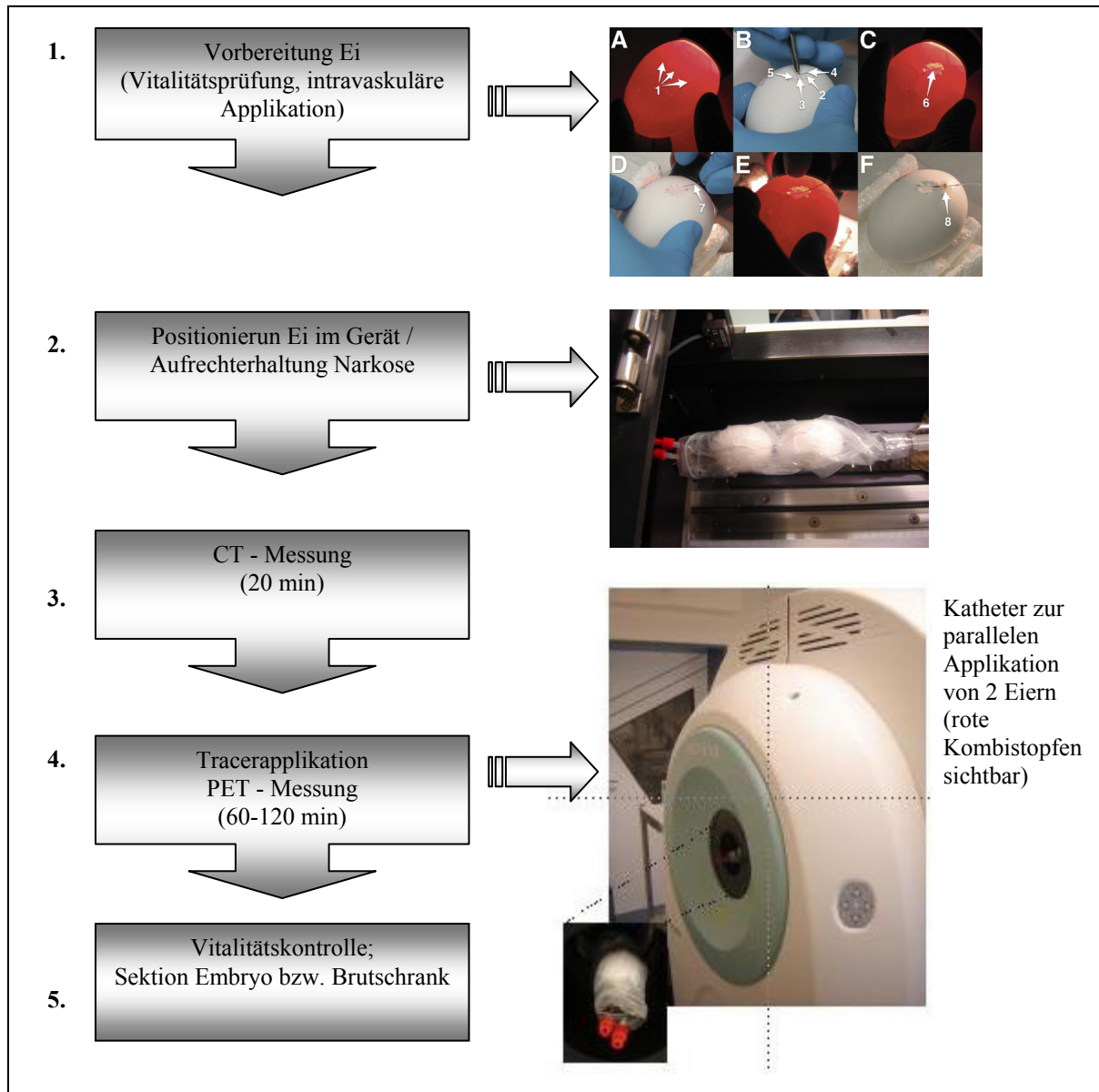
Die narkotisierten Eier wurden zuerst im CT bei folgenden Einstellungen gemessen (Tab. 7):

**Tab. 7: Geräteparameter des Computertomographen (CT)**

Parameter	Wert
Spannung	80 keV
Stromstärke	500 $\mu$ A
Bettpositionen	2
<i>Field of view</i>	12,7 cm
<i>Binning Faktor</i>	4
Rotationswinkel <i>Gantry</i>	360°
Rotationsschritte pro Bettposition	360

Nach Beendigung des CT-Scans, wurde das Bett in das PET - Modul hineingefahren und die Applikation des Tracers erfolgte über das geöffnete hintere *Gate* am Gerät (Abb. 10). Dazu wurde der

auf dem Bett fixierte Katheter gelöst, der Verschlussstopfen entfernt und die das Radionuklid enthaltende 1 ml Spritze vorsichtig mit dem Katheterende verbunden. 5 sec nach Start der PET - Datenaufnahme wurden 100  $\mu$ l des Tracers über eine Zeit von 40 bis 60 sec appliziert. Nach Beendigung der Applikation wurde die Spritze entfernt und der Katheter verschlossen.



**Abb.10: Schematische Darstellung des PET / CT - Messablaufs von Hühnerembryonen *in ovo***

Die PET - Datenaufnahme erfolgte bei folgenden Parametern (Tab. 8):

**Tab. 8: Geräteparameter des PET**

Parameter	Wert
Spannung	350-650 keV
Bettposition	2
Koinzidenzfaktor	3,4 ns
<i>Field of view</i>	12,7 cm
Rotationswinkel <i>Gantry</i>	360°
Rotationsschritte pro Bettposition	360

Nach Abschluss der PET - Messung, wurden die Eier entweder direkt präpariert (Kapitel 3.2.4.) bzw. im Fall von wiederholten Messungen wieder zurück in den Brutschrank gelegt.

### 3.7.4 Rekonstruktion

Die erhobenen PET-Daten wurden mit einem statischen Histogramm rekonstruiert (3D Sinogramm; span 3, ring difference 79). Das erhaltene Sinogramm wurde zu einer 3D - Darstellung rekonstruiert (OSEM3D256).

### 3.7.5 Versuchsaufbau und –ablauf der PET / CT - Messung mittels [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG

Aufbauend auf den *in vitro* LigandTracer® - Experimenten (Kapitel 4.3.2) wurde eine gesteigerten [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation in infizierten Embryonen postuliert. Diese Annahme sollte *in ovo* experimentell untersucht werden, indem 6 Hühnerembryonen am 10. Entwicklungstag über die CAM mit *Cp. psittaci* infiziert wurden. Vergleichende Kontrollembryonen wurden adäquat mit 1 x PBS - Puffer behandelt. Am 6. Tag *post infectionem* wurden die Hühnerembryonen mit einem intravaskulären Katheter versehen (Kapitel 3.2.6), mit Isofluran anästhesiert (Kapitel 3.3.3) und das Glukoseanalogon [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG appliziert. PET - Daten wurden für 60 min erhoben, die Embryonen nachstehend seziiert (Kapitel 3.2.4), Kryoschnitte von Leber sowie Milz angefertigt (Kapitel 3.6) und *Cp. psittaci* histologisch nachgewiesen.

Der gewählte Zeitpunkt *post infectionem* ergab sich aus zwei Gründen. Im vorangeschrittenen Entwicklungszustand der Embryonen (Bebrütungstag 16) wurden auswertungsbedingte Vorteile gesehen. Die Lokalisation der Embryonen sowie die Differenzierung der Organstrukturen im Rahmen der PET / CT - Datenauswertung wurden zu diesem Entwicklungszeitpunkt als zielführender angesehen. Zudem wurden deutliche Unterschiede der Tracerverteilung in infizierten und nicht - infizierten Embryonen infolge der intraembryonalen Erregerpenetration erwartet (Braukmann *et al.*, 2012).

### 3.7.6 Versuchsaufbau und –ablauf der PET / CT - Messung mittels $^{89}\text{Zr}$ - markiertem Antikörper

Für die Untersuchung der Verteilung des  $^{89}\text{Zr}$  - markierten Antikörpers in *Cp. psittaci* - infizierten Hühnerembryonen wurden diese am zehnten Bruttag über die CAM infiziert (Kapitel 3.2.2 und 3.2.3). Vergleichend wurde die Antikörperverteilung an nicht - infizierten, mit 1 x PBS - Puffer behandelten Embryonen, beobachtet. Für die PET / CT - Messung wurden die Embryonen, analog dem [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Experiment, bis zum Bruttag 16 im Brutschrank belassen (Kapitel 3.7.5). Die intravaskuläre Applikation des  $^{89}\text{Zr}$  - markierten Antikörpers erfolgte am sechsten Tag *post infectionem*. Im Anschluss an die 60 - minütige PET / CT - Datenaufnahme wurden die Embryonen im Brutschrank gelagert. Im Rahmen der wiederholenden Langzeituntersuchung der intraembryonalen Erregerpenetration wurden die Untersuchungsobjekte 20 Stunden nach Tracerapplikation erneut mittels PET / CT bewertet. Limitiert wurde dieser Teil der Arbeit, da das Überleben einiger Embryonen zum zweiten Untersuchungszeitpunkt nicht festgestellt werden konnte. In die finale Datenauswertung wurden nur Embryonen einbezogen, die an beiden Messzeitpunkten lebendig waren. Resultierend ergab sich eine reduzierte Anzahl von vier infizierten Embryonen (12 Embryonen wurden appliziert und zu Zeitpunkt 1 im PET / CT gemessen), welche in die Datenauswertung einbezogen wurden.

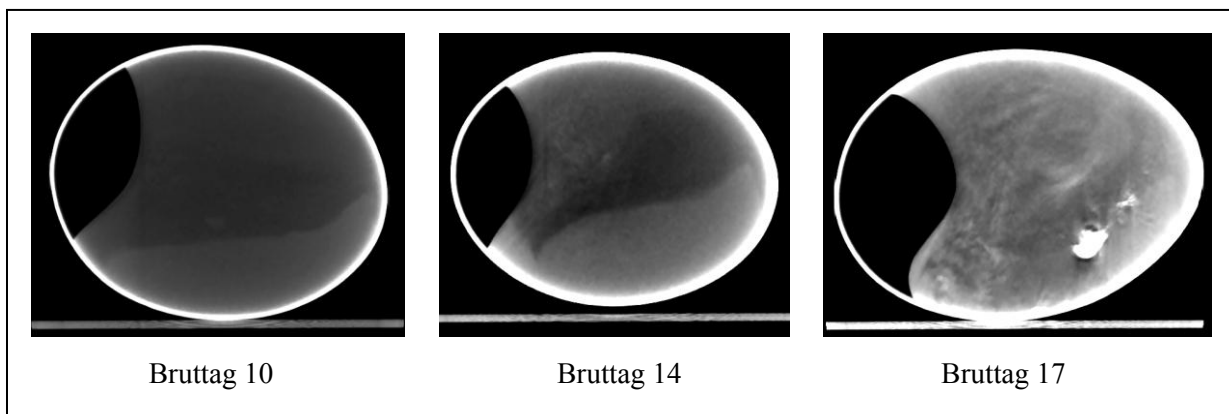
Da keine Daten zur *in ovo* - Verteilung von reinem  $^{89}\text{Zr}$  vorlagen, wurde zudem dessen physiologische Verteilung (als Oxalat-Komplex) an Embryonen von Bruttag 16 nach intravaskulärer Applikation untersucht.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Anästhesie von Hühnerembryonen

Die Mobilität von Hühnerembryonen *in ovo* ist ein entwicklungsphysiologisch immanenter Prozess. Einerseits wird das Verwachsen zwischen Embryo und Fruchthülle sowie zwischen verschiedenen Körperteilen des Embryos verhindert, andererseits wird somit die Amnionflüssigkeit zur Verteilung von Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und dem gelösten Sauerstoff durchmischt.

Durch die natürliche Mobilität von vitalen Embryonen war bisher deren artefaktfreie Darstellung *in ovo* mittels molekularer Bildgebung nicht möglich. Die exakte Positionierung des Embryos sowie die differenzierte Unterscheidung von Bewegungsapparat und Organstrukturen konnte nicht vorgenommen werden (vgl. Abb. 9). Die Immobilisierung des Embryos für PET / CT - Untersuchungen mit Hilfe der Anästhesie war daher unabdingbar.



**Abb. 11: CT-Aufnahmen nicht-anästhesierter Hühnerembryonen an Bruttage 10, 14 und 17**

In ersten Versuchen wurden die zur Langzeitanästhesie eingesetzten Injektionsnarkotika Urethan /  $\alpha$  - Chloralose und Avertin verwendet. Des Weiteren wurde die Wirkung und Anwendbarkeit des Kurzzeit - Inhalationsnarkotikums Isofluran für die *in ovo* PET / CT - Messung betrachtet. Hierbei wurden die Dosierungen der Anästhetika und das Überleben der Embryonen beurteilt. Die Anwendbarkeit der Anästhetika wurde an den Bruttage 10 bis 18 jeweils an drei Embryonen untersucht und mit einer Kontrolle ohne Anästhetikum verglichen.

#### 4.1.1. Kriterien der Anästhesie

Die Beurteilung der Anästhesie erfolgte einerseits anhand der Qualität der CT - Bilder, andererseits durch das Überleben der Embryonen. Die rekonstruierten CT - Aufnahmen wurden nach der Beständigkeit der Position der Embryonen beurteilt. Das Überleben wurde 24 h nach Beginn der Anästhesie mittels Durchleuchtungslampe überprüft.

#### 4.1.2 Bestimmung der eingesetzten Menge des Anästhetikums

Die einzusetzenden Mengen der Narkotika Avertin, Urethan /  $\alpha$  - Chloralose und Isofluran wurden in Abhängigkeit vom Bruttag der Embryonen untersucht und sind nachstehend dargestellt. Geringere Dosierungen induzierten *in ovo* keine ausreichende Anästhesie zur artefaktfreien Bildgebung. Beurteilt wurde der Wirkungseintritt, das Überleben sowie die artefaktfreie Darstellung im CT.

##### 4.1.2.1 Urethan / $\alpha$ - Chloralose (UC)

Das UC - Anästhetikum wurde wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben hergestellt. Die verwendeten Dosierungen des UC - Narkotikums erfolgten in Anlehnung an Sugijama *et al.* (1996) und wurden davon ausgehend an den Entwicklungstag der getesteten Embryonen adaptiert. Die Versuchsreihe wurde auf drei Embryonen sowie eine Kontrolle von Bruttag 10 bis 18 erweitert. Abbildung 12 zeigt graphisch die Dosierungen des UC - Gemischs zur artefaktfreien Bildgebung der Hühnerembryonen. Die exemplarischen CT - Bilder der anästhesierten Embryonen sowie Kontrollen sind in Abbildung 13 dargestellt.

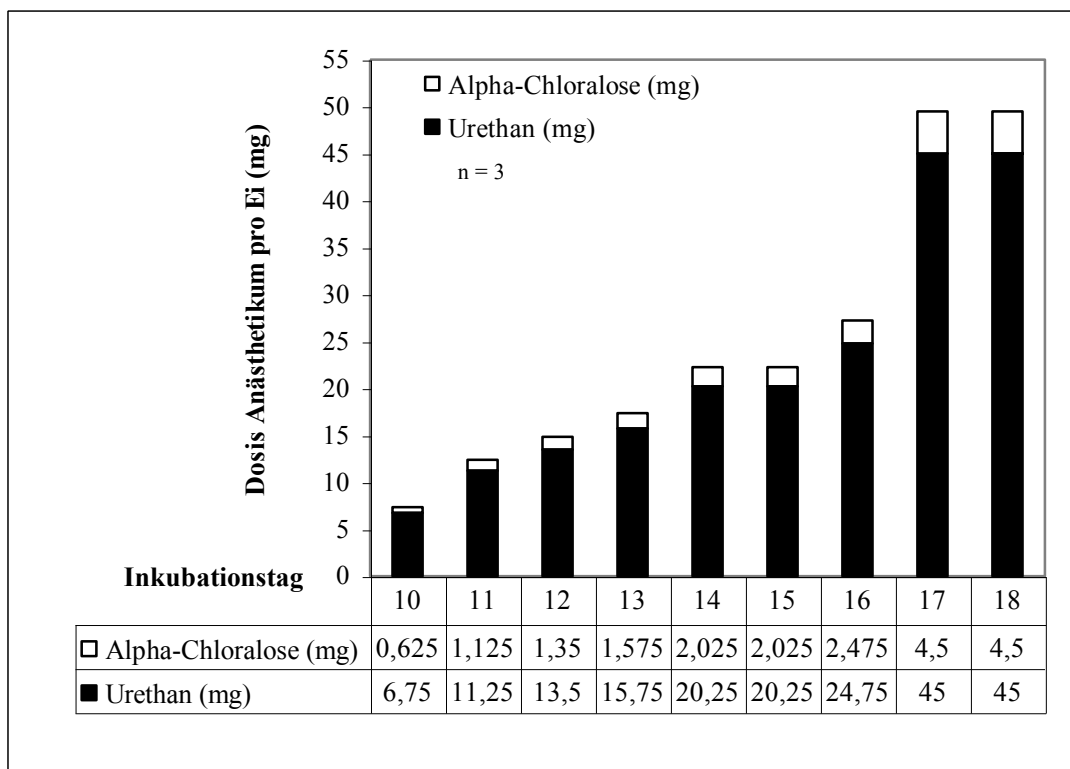
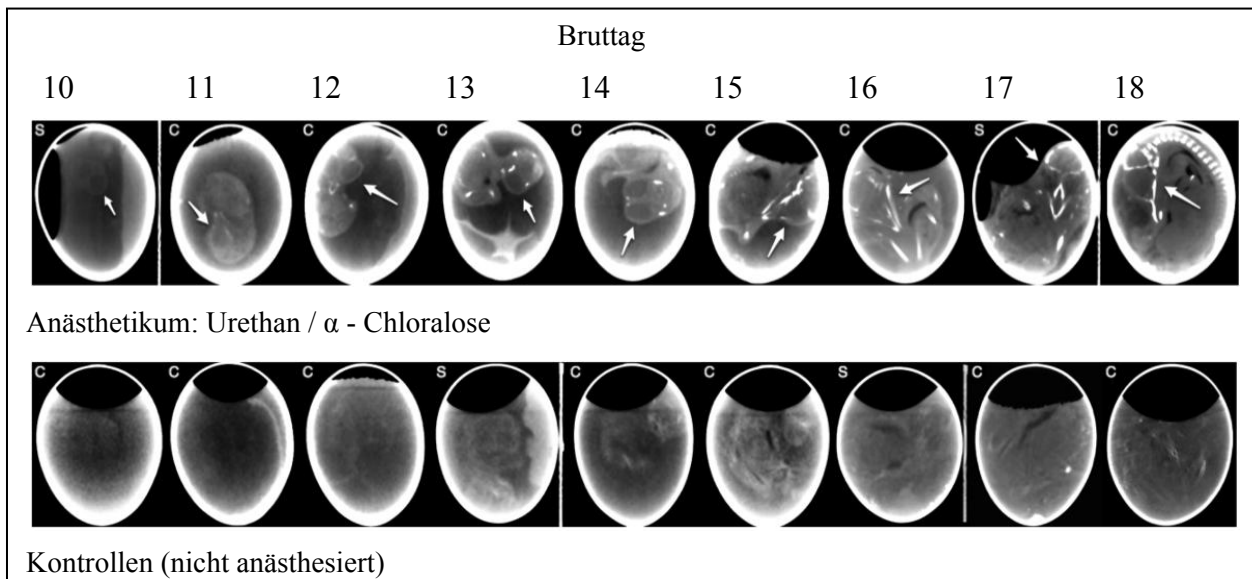


Abb. 12: Verwendete Dosierungen des Urethan /  $\alpha$  - Chloralose-Narkotikums zur Anästhesie von Hühnerembryonen *in ovo* an Bruttag 10 bis 18



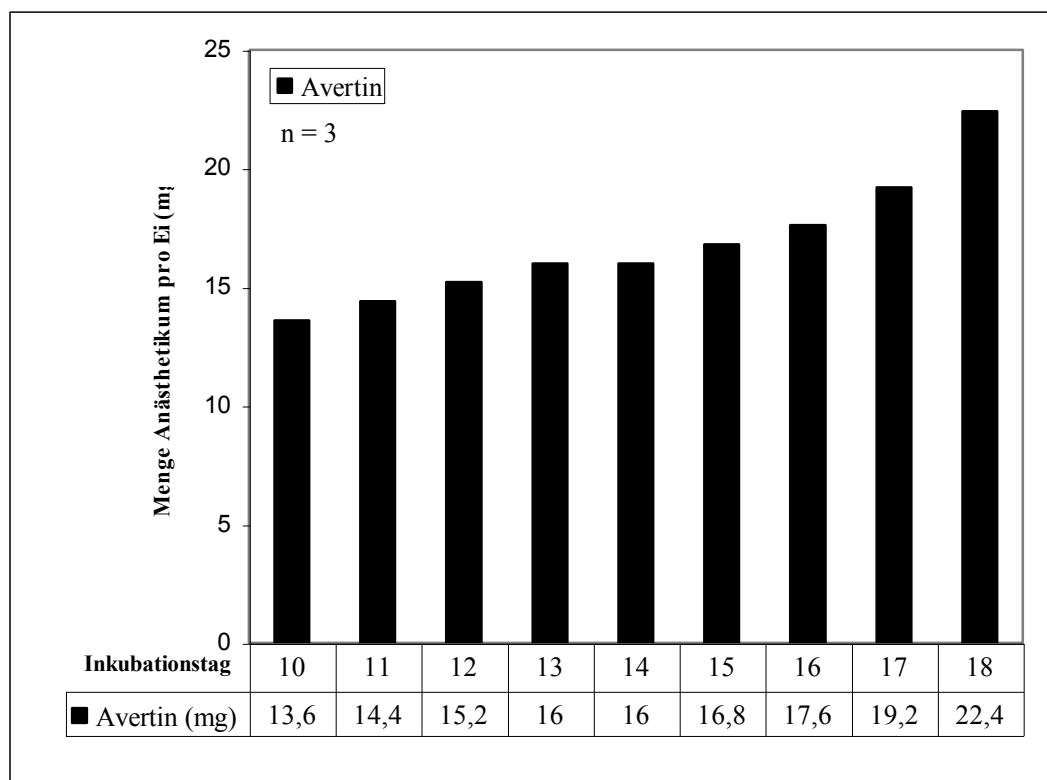
**Abb. 13: CT - Aufnahmen der mit Urethan /  $\alpha$  - Chloralose anästhesierten Hühnerembryonen *in ovo* an Brutttag 10 bis 18 im Vergleich mit unanästhesierten Embryonen (Heidrich & Würbach *et al.*, 2011)**

Der Pfeil markiert die Schädelstruktur des Embryos

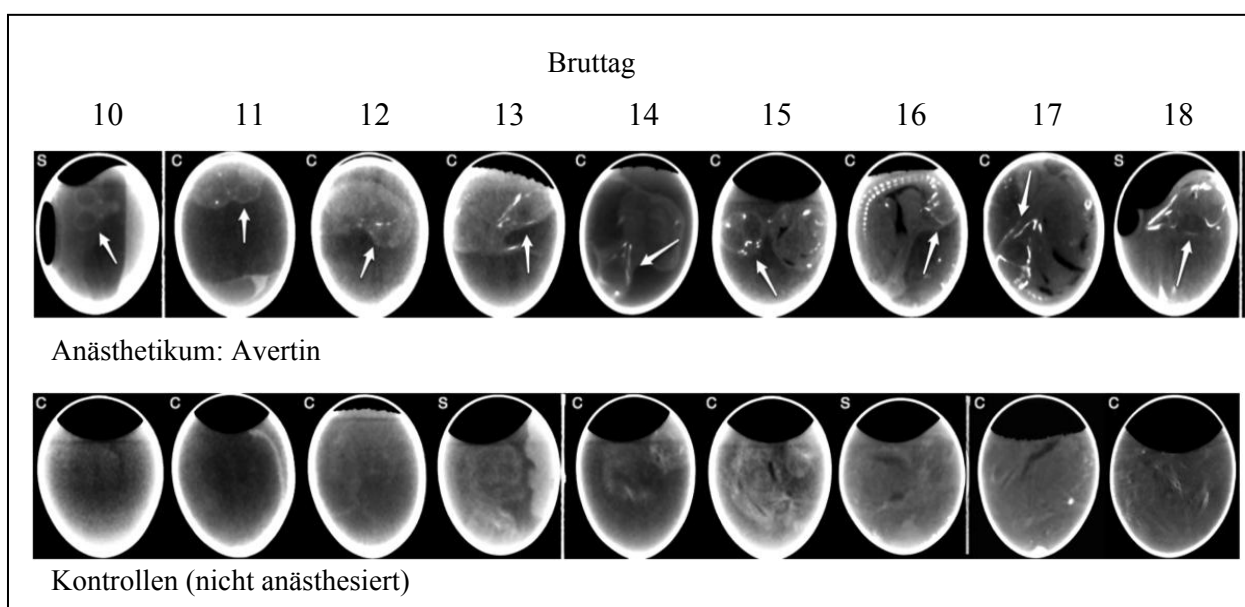
#### 4.1.2.2 Avertin

Für die Anästhesie von Hühnerembryonen *in ovo* mit Avertin konnten aus der Literatur keine Daten entnommen werden. Aus diesem Grund wurden geeignete Dosierungen des Narkotikums für eine Anästhesie unter Berücksichtigung oben genannter Kriterien (Kapitel 4.1.1) bestimmt. Die Titration der Avertin - Dosierung erfolgte zunächst mit Embryonen am Brutttag 15. Basierend auf den Angaben von Papaioannou & Fox (1993), wurde eine Avertin - Arbeitslösung mit 20 mg / ml hergestellt. Erst die Applikation von 0,3 ml (6 mg) der Arbeitslösung auf die CAM führte zu einer geringen Immobilisierung der Embryonen. Um möglichst nah an den physiologischen Bedingungen zu bleiben, sollte das Volumen des Narkotikums zur Applikation auf die CAM so gering wie möglich gehalten werden. Hierzu wurde in nachfolgenden Versuchen unverdünnte Avertin - Stammlösung (1600 mg / ml) direkt auf die CAM gegeben. Geeignete Dosierungen des Anästhetikums für Embryonen von Brutttag 10 bis 18 wurden ermittelt (Abb. 14). Pro Entwicklungstag wurden jeweils drei Embryonen und eine Kontrolle mittels CT untersucht. Die Wirksamkeit des Anästhetikums am Hühnerembryo konnte, verglichen mit den nicht - narkotisierten Kontrollen, in artefaktfreien CT - Bildern an allen Entwicklungstagen gezeigt werden (Abb. 15).





**Abb. 14:** Verwendete Dosierungen des Avertin - Narkotikums zur Anästhesie von Hühnerembryonen *in ovo* an Bruttag 10 bis 18



**Abb. 15:** CT - Aufnahmen der mit Avertin anästhesierten Hühnerembryonen *in ovo* an Bruttag 10 bis 18 im Vergleich mit unanästhesierten Embryonen (Heidrich & Würbach *et al.*, 2011)

Der Pfeil markiert die Schädelstruktur des Embryos

#### 4.1.2.3 Isofluran

Zur Anästhesie von lebenden Hühnerembryonen *in ovo* mit vaporisiertem Isofluran konnten in der Literatur ebenfalls keine Daten gefunden werden. Daher wurde untersucht, ob und unter welchen Bedingungen Isofluran zur Anästhesie eingesetzt werden kann.

In ersten Experimenten konnte eine sedierende Wirkung von 5 % Isofluran exemplarisch bei Embryonen der Bruttag 10 und 13 nach 10 min in einer Narkosekammer festgestellt werden. Da die Bildgebung im CT nicht zufriedenstellend war, wurde die Länge der Inkubationszeiten von Isofluran variiert. Embryonen von Bruttag 10 und 13 wurden 15 min, 30 min, 45 min bzw. 60 min in der Narkosekammer belassen und direkt im CT analysiert. Eine Inkubationszeit mit Isofluran von 30 min ermöglichte die Aufnahme von zwei artefaktfreien Bildern mit je 6 min Erfassungszeit. Für weitere hoch aufgelöste Aufnahmen (je 6 min Erfassungszeit) waren längere Isofluran - Inkubationszeiten von 45 min bzw. 60 min notwendig (Abb. 16).

Bewegungs- reduktion BT 10		Isofluran (5 %) Inkubationszeit			
		15 min	30 min	45 min	60 min
Messung nach	0 min	±	+	+	+
	6 min	+	+	+	+
	12 min	/	±	+	+
	18 min	/	/	±	+
	24 min	/	/	/	±

Bewegungs- reduktion BT 13		Isofluran (5 %) Inkubationszeit			
		15 min	30 min	45 min	60 min
Messung nach	0 min	±	+	+	++
	6 min	+	++	++	++
	12 min	/	±	++	+
	18 min	/	/	±	±
	24 min	/	/	±	±
	36 min	/	/	±	±

/	starke Bewegungsartefakte / keine Bewegungsreduktion
±	geringe Bewegungsartefakte
+	sehr geringe Bewegungsartefakte
++	keine Bewegungsartefakte
BT	Bruttag

**Abb. 16: Beurteilung der Anästhesie mit Isofluran anhand der Bewegung von Hühnerembryonen *in ovo* an Bruttag 10 und 13**

Embryonen wurden exemplarisch an Entwicklungstag 10 und 13 mit 5 % Isofluran in einer Narkosekammer anästhesiert. Beurteilung der Anästhesie anhand der Bewegungsreduktion. Kontrastfreie Darstellung der Embryonen wurde mittels CT überprüft (CT - Bilder nicht dargestellt).

Im Anschluss wurden die Isofluran - Inkubationszeiten auch für Embryonen vom Bruttag 11 und 12 sowie 14 bis 18 ermittelt (Abb. 17). Die Anwendbarkeit von Isofluran zur Anästhesie von Hühnerembryonen konnte an hoch aufgelösten CT-Bildern (Abb. 18) gezeigt werden.

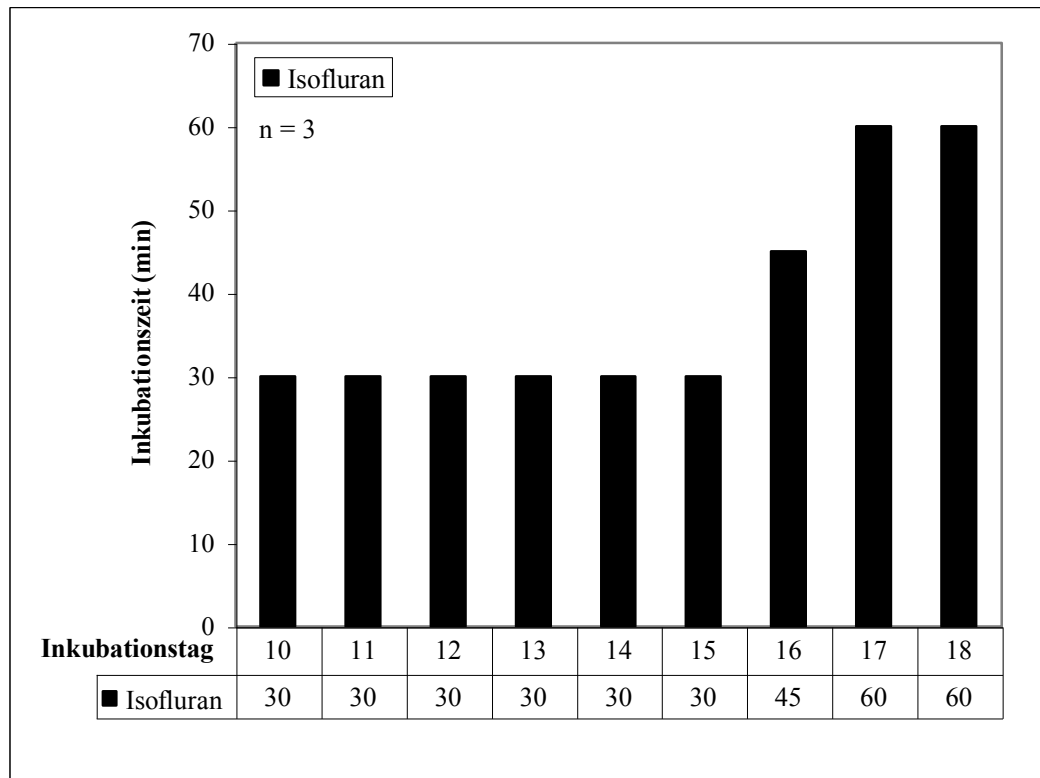


Abb. 17: Inkubationszeiten des Isofluran - Anästhetikums bei Embryonen an Bruttag 10 bis 18

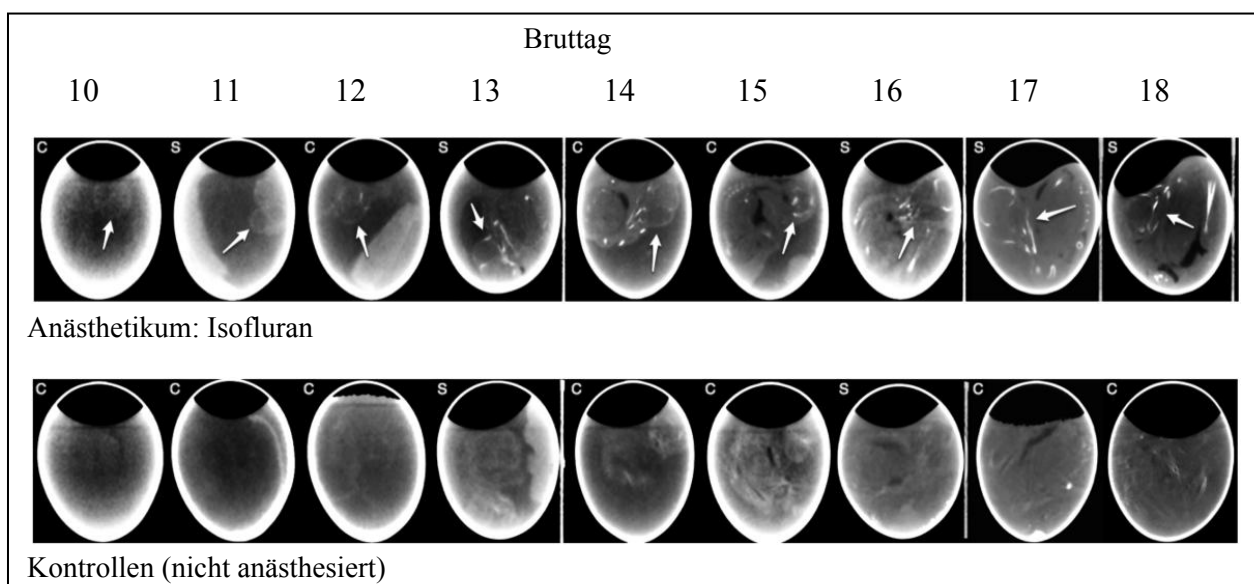


Abb. 18: CT - Bilder der mit Isofluran anästhesierten Hühnerembryonen an Bruttag 10 bis 18 im Vergleich mit unanästhesierten Embryonen (Heidrich & Würbach *et al.*, 2011)

Der Pfeil markiert die Schädelstruktur des Embryos

### **4.1.3 Überleben der Embryonen**

Zur Bestimmung der Überlebensrate von anästhesierten Embryonen wurden diese 24 h nach Applikation bzw. Inkubation mit dem jeweiligen Anästhetikum mittels Durchleuchtungslampe untersucht. Embryonen wurden als abgestorben angesehen, wenn keine Motilität vorhanden war bzw. das Ablösen der CAM vom Inneren der Eischale festgestellt wurde.

#### **4.1.3.1 UC - Anästhesie**

Das UC - Narkotikum führte vor allem bei frühen Bruttagen (10 bis 13) zu hohen Mortalitäten von bis zu ~67 %. Ab Bruttag 14 überlebten zwei von drei und ab Bruttag 15 jeweils alle Embryonen (Tab. 9).

#### **4.1.3.2 Avertin**

Avertin führte bei allen getesteten Dosierungen an Bruttag 10 zu einer Mortalität von 100 %. Erst ab Bruttag 11 überlebten Embryonen die Anästhesie. Von Bruttag 16 bis 18 überlebten jeweils alle untersuchten Embryonen (Tab. 9). Die Wirkungsdauer des Anästhetikums variierte zeitlich zwischen den untersuchten Embryonen. So war die Mobilität einiger Embryonen des gleichen Bruttages bei der Vitalitätskontrolle nach 24 h bereits vollständig wiederhergestellt und entsprach etwa jener der nicht narkotisierten Kontrollembryonen. Andere Embryonen adäquater Entwicklungstage zeigten ein nur eingeschränktes Bewegungsverhalten. Deren Überleben konnte aber durch Schieren zu einem späteren Zeitpunkt eindeutig festgestellt werden. Im Bereich der Injektionsstelle wurden teilweise Ablagerungen beobachtet (Ausfallen der Lösung) die aber keinen kausalen Zusammenhang zum Absterben der Embryonen erkennen ließen.

#### **4.1.3.3 Isofluran**

Die Anästhesie von Embryonen mit Isofluran an verschiedenen Bruttagen zeigte bei fast allen Tieren keinen Einfluss auf das Überleben. Lediglich ein 10 Tage alter Embryo starb nach der Behandlung mit Isofluran (Tab. 9).

**Tab. 9: Anzahl an lebenden Embryonen nach der Anästhesie mit Urethan / Alpha - Chloralose, Avertin und Isofluran an verschiedenen Bruttagen**

Bruttag	UC - Anästhesie	Avertin - Anästhesie	Isofluran - Anästhesie
10	1 von 3	0 von 3	2 von 3
11	1 von 3	3 von 3	3 von 3
12	2 von 3	3 von 3	3 von 3
13	1 von 3	1 von 3	3 von 3
14	2 von 3	2 von 3	3 von 3
15	3 von 3	2 von 3	3 von 3
16	3 von 3	3 von 3	3 von 3
17	3 von 3	3 von 3	3 von 3
18	3 von 3	3 von 3	3 von 3

## 4.2 Etablierung der intravaskulären Applikation von Tracern an Hühnerembryonen *in ovo* für PET / CT - Analysen

Routinemäßig erfolgt die Tracerapplikation zur PET / CT - Untersuchung sowohl im humanmedizinischen Bereich als auch in der Kleintierbildgebung intravaskulär. Bisher wurde jedoch keine geeignete Route zur Applikation von Kontrastmitteln zur CT - Messung und zur Applikation von Radiotracern zur PET - Untersuchung *in ovo* beschrieben. Aus diesem Grund sollte eine geeignete Applikationsroute für die Untersuchung von Aufnahme- und Verteilungskinetiken, speziell von kurzlebigen, hochmolekularen Tracern etabliert werden.

### 4.2.1 Intravaskuläre Applikation mittels Kathetersystem

Zur Manipulation, Untersuchung und Applikation von Hühnerembryonen *in ovo* werden üblicherweise Mikroinjektoren bzw. Mikromanipulatoren eingesetzt. Aufgrund der Größeneinschränkung im PET / CT - Gerät konnten diese Systeme jedoch nicht zur intravaskulären Injektion von Radiotracern verwendet werden. Aus diesem Grund wurde ein microPET - kompatibles Kathetersystem entwickelt, welches kostengünstig und einfach in der Herstellung ist (Kapitel 3.2.5). Die Funktionalität des Systems wurde vor jeder Anwendung sichergestellt, indem 1 x PBS - Puffer durch das System gespült wurde (Kapitel 3.2.5). Um zu gewährleisten, dass das zur Injektion von Hühnerembryonen eingesetzte Kathetersystem keinen Einfluss auf das Überleben des Embryonen hat, wurde dieses an Embryonen getestet. Hierzu wurde der Katheter am zehnten Bruttag in ein Blutgefäß

der CAM eingeführt und fixiert (Kapitel 3.2.6). Das Überleben der Embryonen bis zum Brutttag 18 konnte durch tägliches Schieren überprüft und sichergestellt werden. Eine gesteigerte Mortalität aufgrund des Kathetersystems konnte an 6 untersuchten Embryonen nicht festgestellt werden.

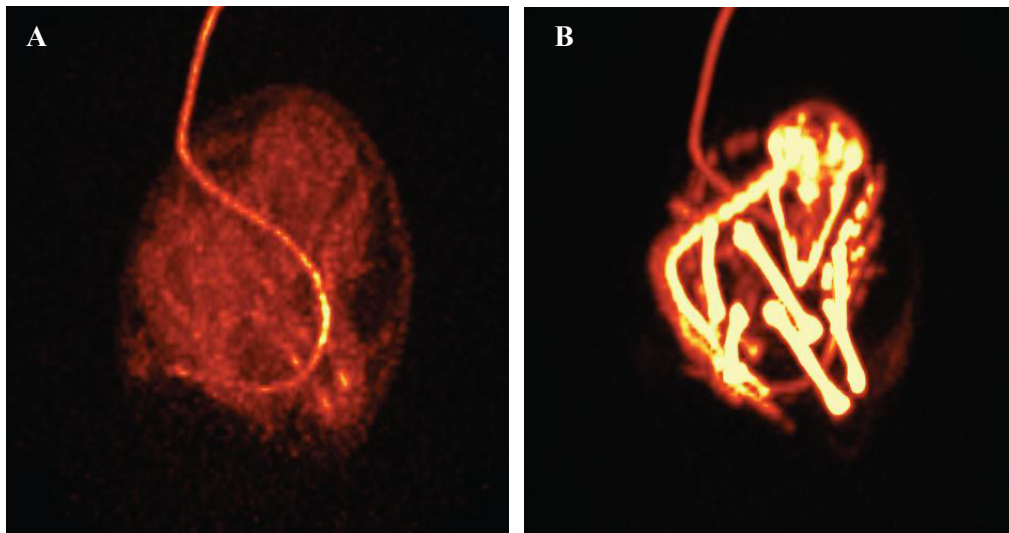
Für viele Langzeitstudien, vor allem bei der Verwendung von kurzlebigen Tracern, muss die Möglichkeit einer wiederholten Applikation bestehen. Deswegen wurde die repetitive Injektion von 1 x PBS sowie dessen Auswirkung auf das Überleben der Embryonen untersucht. Die wiederholte Injektion von 0,1 ml zeigte keinen negativen Einfluss auf das Überleben der Embryonen. Das Obstruieren des Katheters, beispielsweise durch Auskristallisieren des 1 x PBS oder durch koaguliertes Blut, wurde nicht beobachtet. Additiv zur 1 x PBS – Puffer - Applikation wurde die Funktionalität des Kathetersystems für *in ovo* Injektionen am Beispiel der [ $^{18}\text{F}$ ] - Fluorid Applikation untersucht und bestätigt (Kapitel 4.2.2).

#### **4.2.2 Anwendung des Kathetersystems am Beispiel des Knochenmarkers [ $^{18}\text{F}$ ] - Fluorid**

Zur Validierung des Kathetersystems und zur Beurteilung der Tracerverteilung nach intravaskulärer Applikation, wurde [ $^{18}\text{F}$ ] - Fluorid verwendet. Dieser Tracer wird routinemäßig zur Charakterisierung des Knochenstoffwechsels eingesetzt.

Generierte Daten infolge der intravaskulären [ $^{18}\text{F}$ ] - Fluorid Applikation an 18 Tage alten Hühnerembryonen stellen zunächst die physiologische Verteilung des Radiotracers *in ovo* dar. Deutliche Analogien zu den von Bellairs & Osmond (2005) histologisch mit Alizarin-Rot (Mineralisierungsnachweis) und Alzian-Blau (Knorpelfärbung) gefärbten Embryonen konnten festgestellt werden. Homologe Ossifikationsbereiche der *post mortem* Untersuchung entsprechen denen des PET - Bildes und unterstreichen die positive Anwendung dieser Methode.

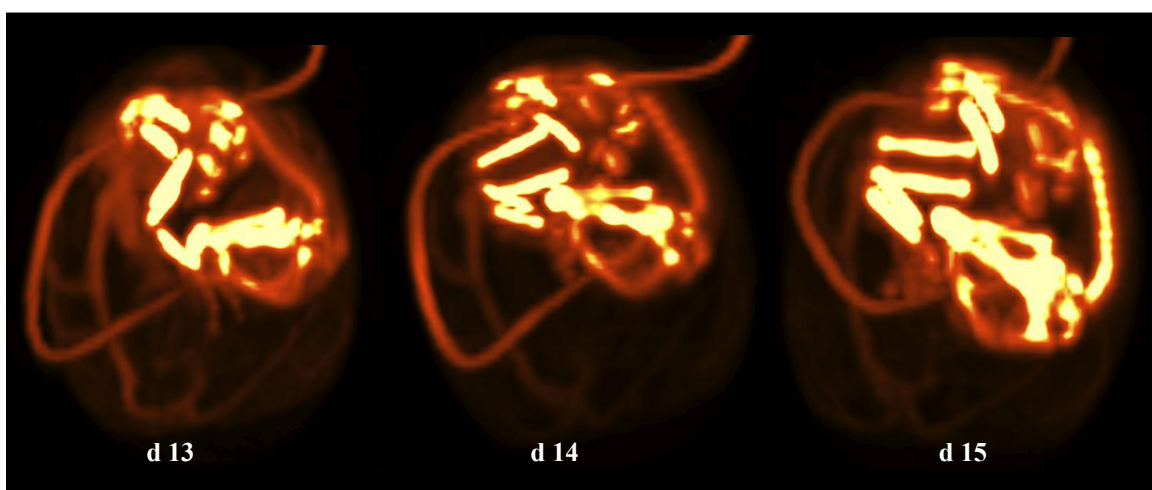
Bei der Betrachtung dynamisch rekonstruierter PET - Bilder zeigte sich eine initiale Anreicherung des Tracers im Herzen, von wo aus dieser mit dem Blutstrom in die Extremitäten verteilt wurde. Erste Anreicherungen in den Knochen konnten bereits 2,5 min nach Applikation beobachtet werden. Nach 75 min waren besonders Bereiche des aktiven Bewegungsapparates mit hoher Ossifikationsrate, wie die Wirbelsäule und die unteren Extremitäten, aber auch der Schnabel deutlich zu erkennen (Abb. 19).



**Abb. 19: PET / CT - Aufnahme der physiologischen Verteilung des Tracers  $[^{18}\text{F}]$  - Fluorid (Würbach & Heidrich *et al.*, 2012)**

Verteilung und Anreicherung des Knochenmarkers  $[^{18}\text{F}]$  - Fluorid eines 18 Tage alten Hühnerembryos *in ovo / in vivo* 2,5 min (A) und 75 min (B) nach intravaskulärer Applikation. Anästhesie mittels Isofluran.

Am Beispiel von  $[^{18}\text{F}]$ -Fluorid sollte nachstehend die wiederholende Applikation mittels Kathetersystem verifiziert werden. Aufbauend auf den 1 x PBS - Versuchen, konnte die repetitive Applikation und PET / CT - Messung an ein und demselben Untersuchungsobjekt durchgeführt werden. Dazu wurden jeweils fünf Embryonen von Bruttag 13 bis 15 durch tägliche  $[^{18}\text{F}]$  - Fluorid Applikation und anschließende PET / CT - Messung im anästhesierten Zustand untersucht. Das Überleben der Embryonen konnte nach Mehrfachinjektion mittels Durchleuchtungslampe sichergestellt werden. Ein deutliches Knochenwachstum wurde an generierten 3-dimensionalen PET / CT - Bildern vor allem zwischen Bruttag 13 und 14 beobachtet (Abb. 20).



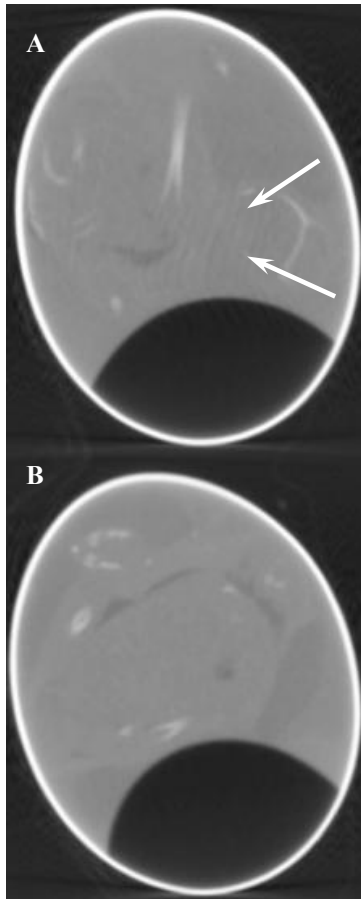
**Abb. 20: PET / CT - Darstellung der Ossifikation eines Hühnerembryos nach wiederholender intravaskulärer Applikation von  $[^{18}\text{F}]$  - Fluorid an Entwicklungstag 13, 14 und 15 (Würbach & Heidrich *et al.*, 2012)**

Verteilung und Anreicherung des Knochenmarkers  $[^{18}\text{F}]$  - Fluorid nach wiederholender intravaskulärer Applikation ein und desselben Embryos. Anästhesie mittels Isofluran.

#### 4.2.3 Optimierung des Kathetersystems

Ein verbreitetes Problem in der CT - Darstellung sind Artefakte, welche durch Metalle induziert werden. In der Humanmedizin werden diese beispielsweise durch Zahnfüllungen oder Hüftprothesen hervorgerufen. Am selbst hergestellten Kathetersystem stellte die intravaskulär fixierte Metallkanüle die Ursache für induzierte Artefakte dar. Typische helle und dunkle Streifenstrukturen im CT - Bild verhinderten eine robuste Auswertung der embryonalen Strukturen (Auslöschungs- und Streuungsartefakte, Abb. 21). Eine Modifikation des Kathetersystems zur Reduktion der metallinduzierten Artefakte wurde deshalb notwendig. Aufbauend auf dem etablierten System wurde zunächst untersucht, ob Glas analog der Metallkanüle eingesetzt werden kann und inwieweit das Überleben der Embryonen beeinflusst wird. Die verwendete Quarzglaskapillare, mit einem Außendurchmesser von circa 300  $\mu\text{m}$  und einen Innendurchmesser von circa 170  $\mu\text{m}$ , wurde vom IPHT in Jena hergestellt. Durch das Spülen mit sterilem 1 x PBS - Puffer wurde die Durchlässigkeit des Systems sichergestellt. Zunächst wurden Glaskapillaren ohne schrägen Schliff verwendet, was jedoch zur Ruptur der Blutgefäße bzw. zu starkem Blutaustritt an der Einstichstelle führte. Für weiterführende Messungen wurden die Glaskatheter deshalb mit einem schrägen Anschliff versehen, der manuell vom IPHT angebracht wurde. Die präparierten Embryonen wurden anschließend mit Isofluran narkotisiert und im CT gemessen. In Abbildung 21 sind vergleichend exemplarische CT - Aufnahmen von Embryonen an Brutttag 17 dargestellt. Nach intravaskulärer Präparation mit Metallkanüle waren deutliche metallinduzierte Artefakte in Form von Streifen sichtbar (Abb. 21 A; Pfeile). Dagegen konnte unter Verwendung einer Glaskanüle der Kontrast der CT - Aufnahme deutlich gesteigert und dadurch die Qualität des Bildes erhöht werden (Abb. 21 B). Aussagen zur Mortalität wurden gewonnen, indem 6 Embryonen vom Brutttag 10 mit einer Glaskanüle in einem Blutgefäß der CAM katheterisiert und bis zum Brutttag 18 durch tägliches Schieren beobachtet wurden. Weder die Katheterisierung mit Glaskanüle noch die Mehrfachmessungen führten zu einer gesteigerten Mortalitätsrate.





**Abb. 21: CT - Aufnahmen von Hühnerembryonen *in ovo* an Brutttag 17**

Kathetersystem für intrasakuläre Präparation mit Metallkanüle (A) und Glaskanüle (B). metallinduzierte Artefakte sind in der Streifenstruktur (A: Pfeil) sichtbar. Die Anästhesie der Embryonen wurde mit Isofluran durchgeführt.

Anfängliche Bedenken zur Stabilität und Bruchsicherheit der Glaskanüle konnten in wiederholten CT - Messungen nicht bestätigt werden. Mechanische Einflüsse im Rahmen der Katheterinsertion in das Blutgefäß, dem Ein- und Ausbauen sowie fixieren im CT - Scanner konnten nicht verzeichnet werden und führten zu keiner Abwertung dieses Systems.

#### **4.3 LigandTracer® - System zur *in vitro* - Charakterisierung einer Chlamydieninfektion**

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien, die als Elementarkörperchen (EB) in die Wirtszelle eindringen. Das metabolisch inerte EB differenziert zu einem metabolisch aktiven Retikularkörperchen (RB). Für die Replikation der RBs notwendige Metabolite werden jedoch nur teilweise vom Pathogen selbst synthetisiert (z.B. Peptidoglykane). In *Cp. psittaci* konnte eine ATP – ADP - Austauschaktivität nachgewiesen werden, mit der die zur RB - Proliferation benötigte Energie über den Wirt bezogen wird (Hatch *et al.*, 1982; Stephens *et al.*, 1998). Seitens der infizierten Wirtszelle erfolgt die Kompensation des erhöhten Energiebedarfs in einer gesteigerten ATP- und Glutamat - Syntheserate, deren zeitliche Einordnung mit dem Maximum der RB - Proliferation übereinstimmt. Die infizierte Zelle zeigt dadurch einen erhöhten Verbrauch an Glukose, der über eine gesteigerte Glukoserezeptorexpression kompensiert wird (Ojcius *et al.*, 1998).

Aufbauend auf diesen Grundlagen wurde untersucht, ob ein infektionsbedingter Mehrbedarf an Glukose seitens der Wirtszelle mittels [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG nachgewiesen werden kann. Mit Hilfe der

LigandTracer® - Apparatur wurden dazu *in vivo* – Echtzeit - Untersuchungen durchgeführt. Tracerakkumulationen infolge pathogener Vorgänge einer akuten inflammatorischen Reaktion, wie die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen sowie die Adhäsion von Granulozyten am Endothel können in diesem *in vitro* - System ausgeschlossen werden.

#### **4.3.1 Adaptierung des LigandTracer® - Systems zur *in vitro* - Charakterisierung von *Cp. psittaci* - Infektionen**

Das LigandTracer® - System findet vor allem in der vergleichenden Untersuchung verschiedener Zelllinien und deren Rezeptor - Bindungsverhalten zu diversen Tracern Anwendung. Angaben zur Verwendung des Systems für Infektionsversuche sind nicht bekannt und machten zunächst die Etablierung notwendig:

##### Messbedingungen

Temperatur:

Die Zellkultivierung erfolgte im Brutschrank bei +37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (Kapitel 3.4). Zur Untersuchung der mit Zellen bewachsenen Petrischalen wurden diese in das LigandTracer® - System eingesetzt. Abweichend von der Gerätegrundeinstellung von +25 °C wurden die infizierten Zellkulturen unter physiologischen Bedingungen von +37 °C untersucht. Eine Anpassung des Messprotokolls erfolgte, indem das Volumen der zugegebenen tracerenthaltenden Lösung von 1 - 2 ml laut Hersteller auf 4 ml erhöht wurde. Eine Reduktion des Lösungsansatzes durch Verdunstung findet nicht nennenswert über längere Meßzeiträume hinweg statt. Für Langzeituntersuchungen ab einer Stunde empfiehlt der Hersteller, die Messung im Brutschrank durchzuführen. Optimalbedingungen von +37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> könnten somit garantiert werden. Hiervon wurde jedoch abgesehen, da die L2 - Arbeiten als zu kritisch bewertet wurden.

Vorlauf:

Gerätetechnisch bedingt erfolgte der Heizprozess auf die eingestellte Temperatur erst, nachdem die Messung und Datenaufnahme gestartet wurde. Die gewünschten +37 °C wurden vor allem bei den ersten Messungen eines Versuchstages erst nach circa 10 – 15 min erreicht. Um homogene Bedingungen für alle Untersuchungsansätze zu gewährleisten, wurde ein Vorlauf von 30 min durchgeführt. In dieser Zeit konnte sich die Temperatur am Gerät einstellen und die Zellen an das Messsystem und die abweichenden Bedingungen vom Brutschrank adaptieren. Nach dem Vorlauf wurde der Tracer zugegeben und die Messdaten erhoben.

Zellkulturmedium:

Für die ersten Versuche wurde [<sup>18</sup>F] - FDG in 1 x PBS - Puffer aufgenommen und auf die Zellen gegeben. Nach einer Messdauer von circa 40 min bei +37 °C zeigte sich jedoch ein starkes Abfallen

der Kurve, was möglicherweise in einem unzureichenden Nährstoffangebot von PBS über eine längere Messdauer (> 30 min) begründet liegt. Das Missverhältnis zwischen vorhandener Glukose einerseits, aber fehlenden essentiellen Aminosäuren, anorganischen Salzen und Vitaminen andererseits, führte zur Stagnation des Wachstums bzw. zum Absterben der Zellen. Aufbauend auf diesen Beobachtungen wurde [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG in allen nachstehenden Versuchen in DMEM - Medium ohne Glukose aufgenommen. Messdaten konnten nach erfolgter Adaptierung bis zu einer Stunde erfasst werden.

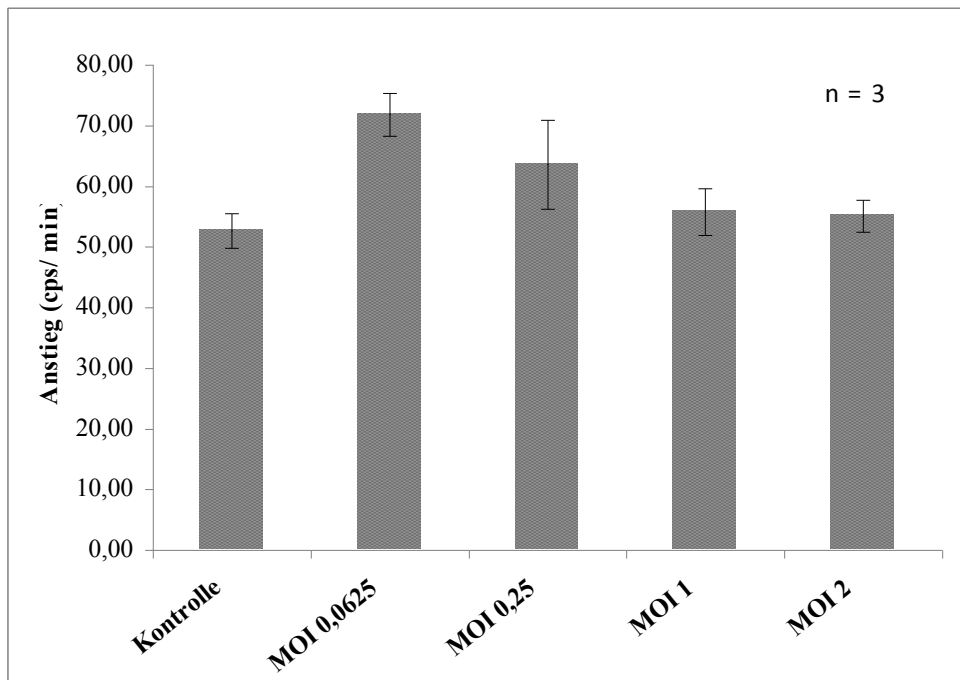
#### Infektionsdosis:

In den ersten Versuchen wurden die Zellen mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 6 infiziert und die [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG-Aufnahme der BGM - Zellen gemessen. Aufgrund des teilweise Ablösens der Zellen von der Petrischale war das Auswerten der Ergebnisse nicht möglich. Ursächlich hierfür wurde das Zusammenwirken der hohen Infektionsdosis und der mechanischen Beanspruchung des Zellrasens durch das Rotieren der Petrischale im Gerät gesehen. In weiterführenden Experimenten wurde die Infektion der Zellen daher mit einer MOI von 2; 1; 0,25 und 0,0625 für 24 Stunden durchgeführt. Das Ablösen des Zellrasens wurde unter diesen Bedingungen nicht mehr beobachtet.

#### **4.3.2 Messung der [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Aufnahme *Cp. psittaci* - infizierter BGM - Zellen und deren Vergleich mit nicht - infizierten Zellen**

Nach Etablierung des Messsystems erfolgte die Beurteilung der [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Aufnahme 24 h nach Infektion der Zellkultur mit verschiedenen Infektionsdosen. Die Werte wurden an jeweils verschiedenen Messtagen erhoben, um eine Aussage zur Reproduzierbarkeit des Systems treffen zu können.

Die [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation der Zellen 24 h nach Infektion kann Abbildung 22 entnommen werden. Mock - infizierte Zellen wiesen die geringste [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation auf. Davon ausgehend zeigten *Cp. psittaci* - infizierte Zellen gesteigerte Tracerakkumulationen.



**Abb. 22: [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation *Cp. psittaci* - infizierter Zellen im Vergleich zu nicht - infizierten Zellen**

BGM - Zellen wurden mit *Cp. psittaci* infiziert (MOI 0,0625; 0,25; 1, 2) oder Mock - infiziert 24 h inkubiert. Die [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Anreicherung wurde mittels LigandTracer® - System untersucht.

Die geringste Infektionsdosis (MOI 0,0625) führte zu einer um +36,34 % erhöhten [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Aufnahme, verglichen mit uninfizierten Zellen. Bei einer MOI von 0,25 war die Aufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG um +20,66 % höher als bei den Kontrollzellen. Wesentlich geringer fällt der Unterschied zu den Kontrolle bei der MOI von 1 (+5,84 %) und MOI von 2 (+4,57 %) aus.

#### 4.4 Untersuchung von *Cp. psittaci* -Infektionen am embryonierten Hühnerei mittels [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG

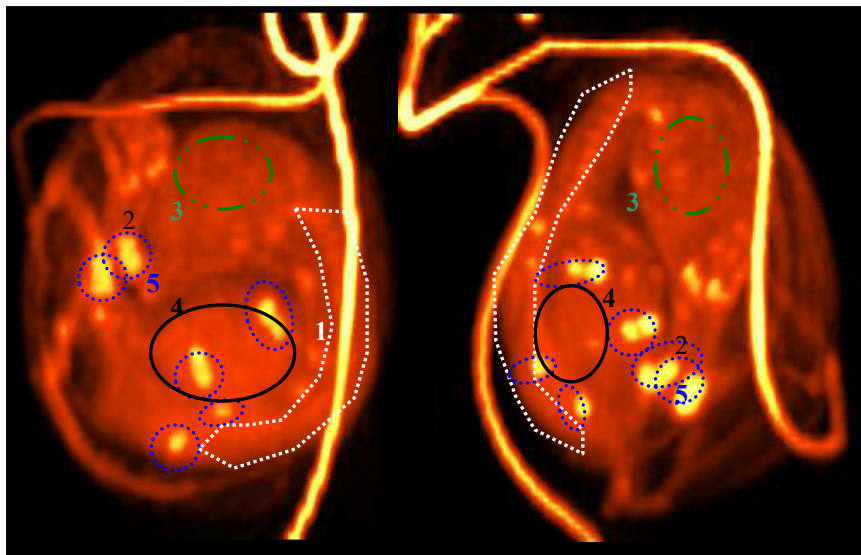
[ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - PET ist ein bildgebendes Verfahren, das vor allem in der Diagnostik von Krebserkrankungen Anwendung findet. Auf Grundlage eines gesteigerten Glukosebedarfs in den meisten Tumoren, kommt es zur erhöhten Akkumulation von [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG im neoplastischen Gewebe. Auf dem gleichen Prinzip beruht die Darstellung von Entzündungs- und Infektionsprozessen, findet aber in der Praxis nur geringen Einsatz. Infektionsprozesse, vor allem der Nachweis intrazellulärer chlamydialer Pathogene, sind in der Literatur kaum beschrieben. Bianco *et al.* (2010) wiesen am humanen Fallbeispiel eine positive [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Aufnahme aufgrund einer *Cp. pneumoniae* - Infektion nach. In der Literatur konnten jedoch keine Angaben zum *in ovo* - Nachweis einer *Cp. psittaci* - Infektion mittels [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - PET gefunden werden.

Aufbauend auf den *in vitro* erhobenen LigandTracer® - Daten einer gesteigerten [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation in *Cp. psittaci* - infizierten BGM - Zellen (Kapitel 4.3.2) sowie den Ergebnissen von

Bianco *et al.* (2010) wurde untersucht, ob Infektionen *in ovo* mittels [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG nachgewiesen werden können. Hierzu wurden Hühnerembryonen mit *Cp. psittaci* infiziert und mittels [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - PET analysiert.

#### 4.4.1 Physiologisches Aktivitätsverteilungsmuster von [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG *in ovo*

Die PET-Aufnahmen (Abb.: 23) zeigen exemplarisch die physiologische *in ovo* [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Verteilung nach intravaskulärer Applikation von nicht - infizierten Hühnerembryonen. Im humanmedizinischen Bereich werden Akkumulationen in den nachstehenden glukosestoffwechselaktiven Organen beschrieben: Anreicherungen in Gehirn, Myokard, Knochenmark, Magen und Darm werden als physiologisch normal betrachtet. In Leber und Milz stellt sich die [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Anreicherung als gering und diffus dar. Im Fall von Infektionen kann die Milz davon abweichend jedoch höhere Aktivitäten aufweisen (Love *et al.*, 2005). Aufgrund der geringen Größe des Untersuchungsobjektes und der damit einhergehenden minimalen Kontrastierung von Organstrukturen konnte die physiologische Verteilung von [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG *in ovo* nur eingeschränkt bewertet werden. Nach Applikation des Tracers wurde eine Akkumulation im Knochenmark (Abb. 23; Wirbelsäule 1, Knochen 2), im Bereich des Schädels (Abb. 23; 3), der Leber (Abb. 23; 4) sowie den Gelenken (Abb. 23; 5) intraembryonal beobachtet. Die Anreicherung von [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG war besonders auffällig in den Gelenkregionen, vor allem der unteren Extremitäten. Aussagen zur physiologischen Aktivitätsverteilung innerhalb anderer anatomischer Strukturen wie Magen oder Darm konnten nicht vorgenommen werden.



**Abb. 23: *In ovo* [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Verteilung in nicht - infizierten Hühnerembryonen (Brutttag 16)**

Exemplarische Darstellung von PET - Aufnahmen nicht - infizierter Embryonen nach intravaskulärer [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Applikation. Anästhesie mittels Isofluran. Tracerakkumulationen in der Wirbelsäule (1), den Knochen (2; untere Extremitäten), im Schädel (3), der Leber (4) und den Gelenken (5) sichtbar. n = 6

Da es sich bei Hühnervögeln um Nestflüchter handelt, ist die Entwicklung des Bewegungsapparates von immanenter Bedeutung. Hohe Stoffwechselaktivitäten der Gelenkregionen stellen die Voraussetzung für ossifizierende Prozesse dar und drücken sich in gesteigerten [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulationen aus.

#### 4.4.3 Quantitative Auswertung der [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation *in ovo*

Die statische Auswertung und Rekonstruktion (OSEM3D) der PET - Daten erfolgte mit Hilfe der IRW Software 3.0 (*Inveon Research Workplace*). Zur besseren Orientierung und Zuordnung der Position des Embryos im Ei wurden das PET- und das CT - Bild fusioniert und anhand der Knochenstrukturen die Lage des Embryos bestimmt. Die manuelle Auswertung sollte unbefangen von der Tracer - Akkumulationen im PET - Bild vorgenommen werden. Die zu untersuchende Struktur sollte daher im CT - Bild detektiert und als *region of interest* (ROI) markiert werden. Die erhaltene ROI müsste idealerweise erst nachfolgend auf das PET - Bild übertragen und mittels Software ausgewertet werden. Aufgrund der geringen Größe der Embryonen konnte eine eindeutige Zuordnung von Organstrukturen mit Hilfe dieser Methode im CT - Bild, selbst an Brutttag 16, nicht erfolgen. Versuche, Algorithmen zur Auswertung (z.B. Orientierung an Knochenstrukturen als Ausgangspunkt zum Markieren der ROIs) zu entwickeln, schlugen fehl, denn die embryonale Position *in ovo* variierte teils erheblich innerhalb verschiedener Untersuchungsobjekte. Die relative Lage von Knochen als möglicher Orientierungspunkt zur Determinierung von Organstrukturen zeigte Abweichungen auf, sodass das PET - Bild in die Auswertung einbezogen wurde. Die ROIs wurden immer nach dem gleichen Prinzip in verschiedenen Schnittebenen markiert und eine Gesamt - ROI eines definierten Volumens interpoliert. Es wurden ROIs von Gehirn, Leber, Milz und dem Gelenk zwischen Tibiotarsus und Metatarsus (links) eingezeichnet. Die Volumina der ROIs können Tabelle 10 entnommen werden.

**Tab. 10: Volumina der ROI - Strukturen für Embryonen an Brutttag 16**

Organ	Volumen
Schädel / Gehirn	~ 200 mm <sup>3</sup>
Leber	~ 850 mm <sup>3</sup>
Milz	~ 100 mm <sup>3</sup>
Gelenk (zwischen Tibiotarsus und Metatarsus)	~ 100 mm <sup>3</sup>

Während der Tracer - Applikation verblieben unterschiedliche Mengen an [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG im Kathetersystem zurück. Zur Bestimmung der Restaktivität im Schlauchsystem hätte eine Entfernung aus dem Blutgefäß erfolgen müssen. Um ein Nachbluten und das unkontrollierte Austreten des Tracers aus dem Ei zu verhindern, wurde der Katheter im Untersuchungsobjekt belassen. Die tatsächlich im Ei vorhandene Aktivität (Bq / ml) an [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG wurde deshalb nachträglich bei der Bildauswertung bestimmt. Dazu wurde eine ROI über das gesamte Ei (ohne Katheter) gezeichnet und die injizierte Dosis im Ei berechnet (Volumen Ei multipliziert mit applizierter Aktivität im Ei). Die markierten ROIs wurden anschließend auf die tatsächlich im Ei befindliche Aktivitätsmenge korrigiert. Aufgrund der Anpassung der tatsächlichen Dosis an [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG *in ovo* wurden auch die Werte der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% ID / g) für jede ROI korrigiert. Dazu wurde die ROI - Aktivitätskonzentration (Bq / mL) durch die korrigierte injizierte Dosis im Ei dividiert und mit 100

multipliziert. Die ermittelten % ID / g - Werte der Kontrollembryonen sind in Tabelle 11 und die der infizierten Embryonen in Tabelle 12 dargestellt:

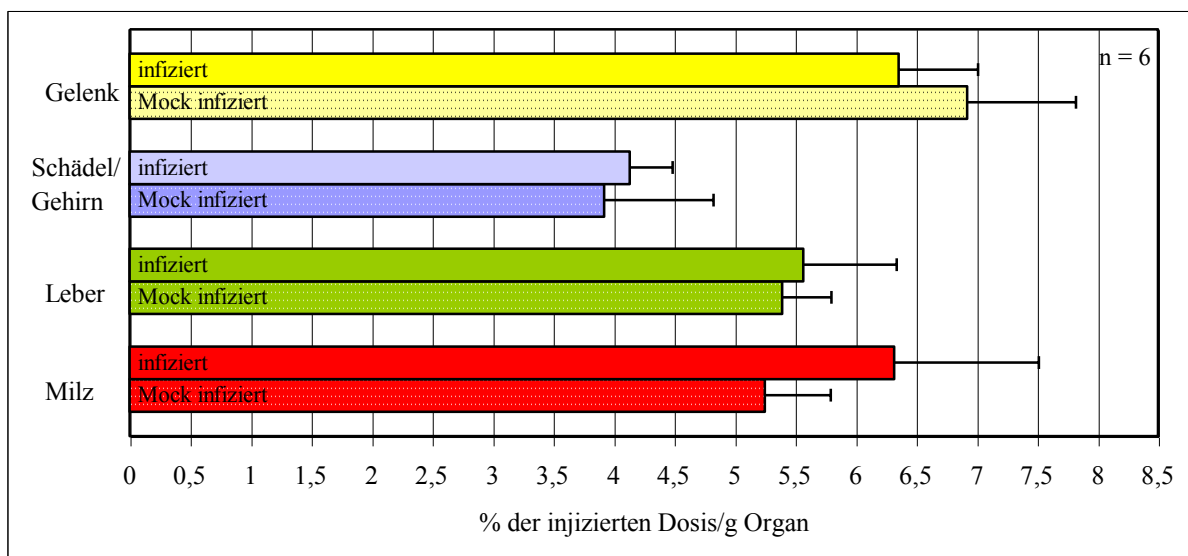
**Tab. 11: [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG - Aktivität der Kontrollembryonen in % ID / g an Brutttag 16**

[ $^{18}\text{F}$ ] - Aktivität						
in % ID / g (korrigiert)	Embryo 1	Embryo 2	Embryo 3	Embryo 4	Embryo 5	Embryo 6
Ei	1,47	1,69	1,53	1,48	1,61	1,62
Milz	4,58	4,74	6,09	5,50	5,34	5,26
Leber	5,76	5,96	5,49	5,06	5,01	5,06
Schädel / Gehirn	3,90	4,03	3,98	4,16	3,96	3,50
Gelenk	6,30	6,52	6,25	8,65	7,08	6,74

**Tab. 12: [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Aktivität der infizierten Embryonen in % ID / g an Brutttag 16**

[ $^{18}\text{F}$ ] - Aktivität						
in % ID / g (korrigiert)	Embryo 7	Embryo 8	Embryo 9	Embryo 10	Embryo 11	Embryo 12
Ei	1,78	1,88	1,88	1,93	1,71	1,75
Milz	5,52	7,14	7,73	6,90	4,46	6,18
Leber	5,31	6,88	5,90	5,46	4,59	5,27
Schädel / Gehirn	4,00	4,44	4,44	4,44	3,67	3,80
Gelenk	7,44	5,92	5,80	6,87	5,91	6,21

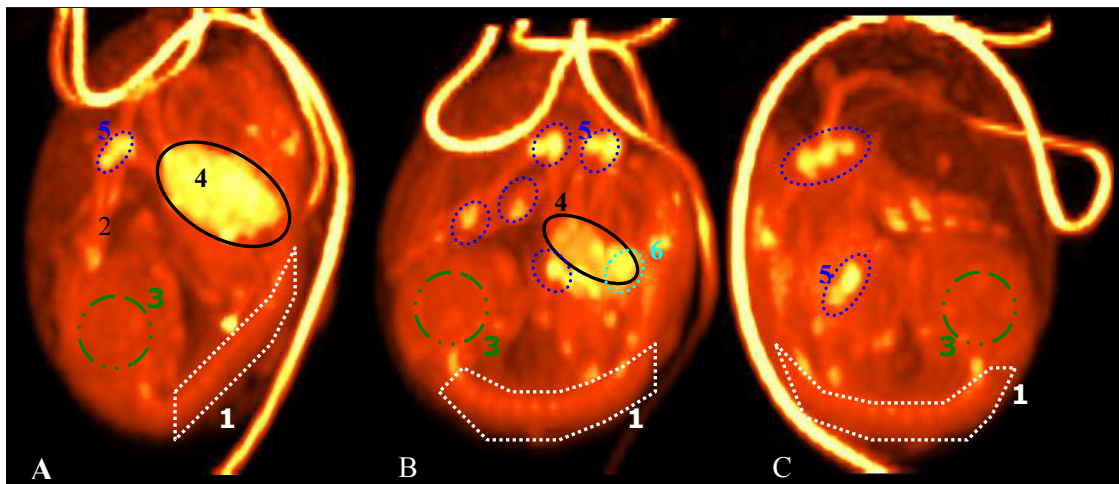
Aus den generierten Werten wurde anschließend der Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt (Tab. 13 und 14).



**Abb. 24: Mittelwerte und Standardabweichungen der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% ID / g) von [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG in verschiedenen Gewebeproben *in ovo* an Brutttag 16**

Bei vergleichender Betrachtung der gemessenen Dosis an  $[^{18}\text{F}]$  - FDG konnte in *Cp. psittaci* - infizierten und Mock - infizierten Embryonen erwartungsgemäß eine divergierende  $[^{18}\text{F}]$  - FDG - Anreicherung beobachtet werden. Verglichen mit den Kontrollen zeigten infizierte Untersuchungsobjekte im Mittel höhere  $[^{18}\text{F}]$  - FDG - Akkumulationen in der Leber (+3,34 %), der Milz (+20,38 %) und dem Schädel (+5,36 %). Im Gelenkbereich wurde bei den infizierten Embryonen im Mittel eine verminderte  $[^{18}\text{F}]$  - FDG - Akkumulation (-9,83 %) festgestellt.

Bei differenzierter Betrachtung der rekonstruierten PET / CT - Bilder infizierter Embryonen war kein homogenes Akkumulationsprofil von  $[^{18}\text{F}]$  - FDG sichtbar. In einigen Embryonen konnte eine starke Anreicherung im Bereich der Leber (Abb.: 25, A) verzeichnet werden, während andere Embryonen die höchste Akkumulation im Bereich der Milz (Abb.: 25, B) zeigten. Abbildung 25, C zeigt eine exemplarische PET - Aufnahme eines infizierten Embryos, bei dem keine *hot spots* detektiert werden konnten.



**Abb. 25:** *In ovo*  $[^{18}\text{F}]$  - FDG - Verteilung nach Infektion von Hühnerembryonen an Bruttag 16 mit *Cp. psittaci*

PET - Analyse von *Cp. psittaci* - infizierten Hühnerembryonen an Tag 6 *post infectionem*. Exemplarische Darstellung von drei Embryonen (A, B, C) nach intravaskulärer Applikation von  $[^{18}\text{F}]$  - FDG. Anästhesie mit Isofluran. Tracerakkumulation in der Wirbelsäule (1), den Knochen (2; untere Extremitäten), im Schädel (3), der Leber (4), den Gelenken (5) und der Milz (6) sichtbar. n = 6

Da anhand der gemittelten Werte kein einheitlicher Trend der Akkumulation in infizierten Embryonen beobachtet werden konnte, wurden im Anschluss die Ergebnisse der einzelnen Embryonen separat betrachtet (Tab. 13). Die angegebenen prozentualen Werte stellen die Zu- bzw. Abnahme der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% ID / g), bezogen auf die Mittelwerte der Kontrollen, dar.



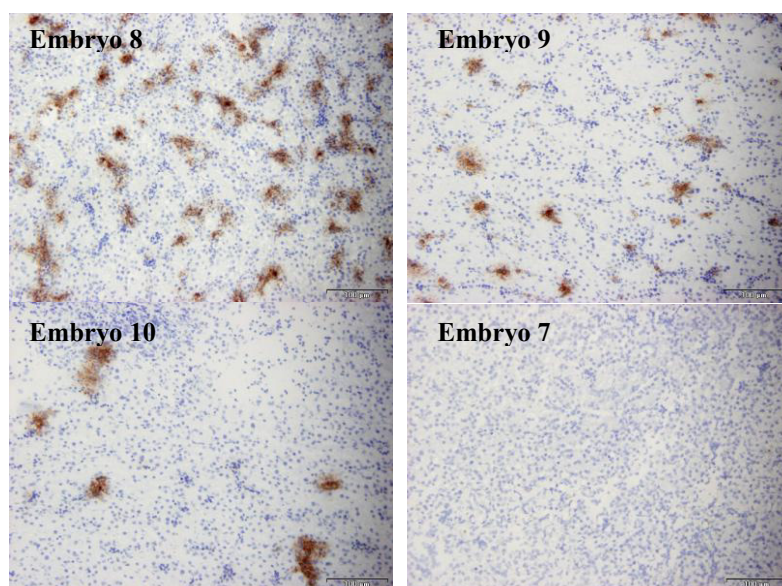
**Tab. 13: Änderungen der [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation in infizierten Embryonen bezogen auf Mock - infizierte Kontrollembryonen**

[ $^{18}\text{F}$ ] - Aktivität in % ID / g (korrigiert)	Embryo 7	Embryo 8	Embryo 9	Embryo 10	Embryo 11	Embryo 12
Milz	+ 5,10 %	+ 35,96 %	+ 47,22 %	+ 31,43 %	- 15,19 %	+ 17,66 %
Leber	+ 2,41 %	+ 27,65 %	+ 9,39 %	+ 1,36 %	- 14,87 %	- 2,24 %
Schädel / Gehirn	+ 2,31 %	+ 13,33 %	+ 13,36 %	+ 13,18 %	- 6,96 %	- 3,18 %
Gelenk	- 7,42 %	- 14,43 %	- 16,26 %	- 0,81 %	- 14,83 %	- 10,29 %

Die *Cp. psittaci* - infizierten Hühnerembryonen zeigen kein homogenes Akkumulationsmuster. Beim Betrachten der einzelnen Embryonen konnten jedoch in 50 % der Fälle (3 von 6 Embryonen) eine um mehr als 30 % gesteigerte Anreicherung in der Milz, verglichen mit Kontrollembryonen, beobachtet werden. Zusätzlich wurden in der Leber und dem Gehirn höhere Dosen an [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG, verglichen mit nicht - infizierten Embryonen, gemessen.

#### **4.4.4 Histologischer Nachweis von *Cp. psittaci* in Leber und Milz infizierter sowie nicht - infizierter Embryonen**

Im Anschluss an die quantitative Auswertung der [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG-Anreicherung in infizierten und nicht-infizierten Hühnerembryonen, wurde das Ausmaß der *Cp. psittaci* - Penetration von Leber und Milz in histologischen Ansätzen quantitativ untersucht. Von einer molekularbiologischen Untersuchung mittels real – time - PCR wurde aufgrund des geringen Probenmaterials, vor allem bei der Milz, abgesehen. Zur Analyse ausreichendes Probenmaterial könnte nur durch das Vereinen von Gewebe verschiedenen Embryonen gewonnen werden. Vor dem Hintergrund individueller Divergenzen des Infektionsgeschehens könnte genannte Problematik nicht zielführend beleuchtet werden (Kapitel 4.4.3). Hierzu wurden Embryonen am Bruttag 10 mit *Cp. psittaci* über die CAM infiziert (Kapitel 3.2.2 und 3.2.3) und die Organe am sechsten Tag *post infectionem* entnommen. Die PAP - gefärbten Kryoschnitte (Kapitel 3.6) wurden lichtmikroskopisch ausgewertet und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (*colony forming unit* = cfu) aus der Leber und Milz von infizierten sowie nicht - infizierten Embryonen bestimmt (Abb.: 26, 27). Bei den nicht - infizierten Embryonen konnten in keinem der untersuchten Organe *Cp. psittaci* - Kolonien nachgewiesen werden. Eine unspezifische Reaktion des anti-Chlamydia-LPS-Antikörpers wurde ausgeschlossen, indem anstelle des spezifische Primärantikörpers 1 x PBS verwendet wurde.



**Abb. 26: Histologische Darstellung der Leber von *Cp. psittaci* - infizierten Embryonen**

*Cp. psittaci* - Kolonien sind in braun dargestellt (Mouse Anti Chlamydia LPS; BDI168 Santa Cruz;; Goat Anti Mouse Immunoglobulin/HRP konjugiert; ZHRP Dako), Zellkerne sind mittels Hämalaun blau gefärbt; Unterschiede in der Penetration von *Cp. psittaci* drücken sich trotz homologer Infektionsdosis der Embryonen in unterschiedlichen Koloniezahlen aus. Vergrößerung 20 x Skalierungsbalken = 100 µm

Die resultierenden Ergebnisse der quantitativen, histologischen Auswertungen sind Tabelle 14 zu entnehmen. Dargestellt sind die detektierten *Cp. psittaci* - Kolonien (cfu) in der untersuchten Leber infizierter Embryonen. Cfu - Gesamt gibt dabei die Anzahl der Kolonie je betrachteter Gewebefläche an, woraus nachstehend die Kolonien pro mm<sup>2</sup> - Gewebe berechnet wurden.

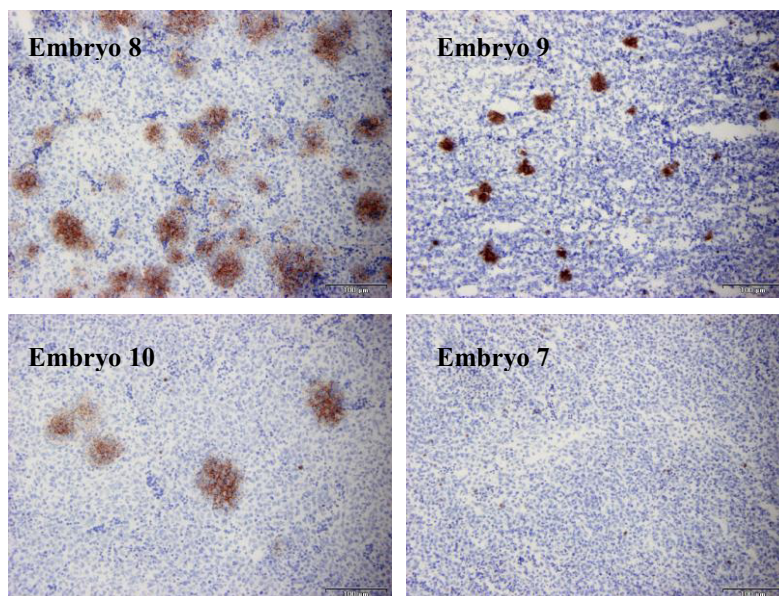
**Tab. 14: Anzahl der *Cp. psittaci* - Kolonien (cfu) in histologischen Färbungen der Leber von infizierten Embryonen**

	Embryo 7	Embryo 8	Embryo 9	Embryo 10	Embryo 11	Embryo 12
cfu Gesamt (3,13 mm <sup>2</sup> )	0	40,15 ± 1,81	14,83 ± 1,17	5,90 ± 1,48	0	4,40 ± 0,16
cfu / mm <sup>2</sup>	0	12,83	4,74	1,89	0	1,41

(n = 40 Gesichtsfelder)

Die stärkste Gewebepenetration konnte bei Embryo 8 nachgewiesen werden. Der zweithöchste ermittelte Wert an chlamydialen Kolonien wurde bei Embryo 9, gefolgt von Embryo 10 und 12 festgestellt. Zwei der infizierten Embryonen (7 und 11) zeigten im Rahmen der histologischen Untersuchung keine Penetration des Erregers im betrachteten Gewebe.

Vergleichbare Ergebnisse konnten bei der Auszählung der cfu in histologischen Schnitten von infiziertem Milzgewebe festgestellt werden (Abb.: 27).



**Abb. 27 : Histologische Darstellung der Milz von *Cp. psittaci* - infizierten Embryonen**

*Cp. psittaci* - Kolonien sind in braun dargestellt (Mouse Anti Chlamydia LPS; monoklonal; BDI168 Santa Cruz; Goat Anti Mouse Immunglobulin/HRP konjugiert; polyklonal; ZHRP Dako), Zellkerne sind mittels Hämalun blau gefärbt; Unterschiede in der Penetration von *Cp. psittaci* drücken sich trotz homologer Infektionsdosis der Embryonen in unterschiedlichen Koloniezahlen aus. Vergrößerung 20 x Skalierungsbalken = 100  $\mu$ m

Nachfolgende Tabelle 15 fasst die Ergebnisse der quantitativen, histologischen Auswertung des untersuchten Milzgewebes der *Cp. psittaci* - infizierten Embryonen zusammen. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (cfu) ist für die betrachteten Gesichtsfelder des jeweiligen Organs sowie für jeweils 1 mm<sup>2</sup> berechnet angegeben.

**Tab. 15: Anzahl der *Cp.psittaci* - Kolonien (cfu) in histologischen Färbungen der Milz von infizierten Embryonen**

	Embryo 7	Embryo 8	Embryo 9	Embryo 10	Embryo 11	Embryo 12
cfu Gesamt (3,13 mm <sup>2</sup> )	0	17,48 $\pm$ 2,52	9,50 $\pm$ 3,22	5,40 $\pm$ 1,70	0,025 $\pm$ 0,5	2,30 $\pm$ 0,83
cfu / mm <sup>2</sup>	0	5,59	3,04	1,73	0,01	0,74

(n = 40 Gesichtsfelder)

Die erhobenen Werte des histologisch untersuchten Milzgewebes zeigen eine deutliche Organpenetration von *Cp. psittaci* bei Embryo 8, gefolgt von Embryo 9, 10 und 12. Bei Embryo 11 wurde in den 40 ausgewerteten Gesichtsfeldern lediglich eine koloniebildende Einheit und bei Embryo 7 keine Chlamydien - Kolonie nachgewiesen.

#### 4.5 Untersuchung von *Cp. psittaci* - Infektionen am embryonierten Hühnerei mittels <sup>89</sup>Zr - markierter chlamydienspezifischer Antikörper

Chlamydiale Antigene können sehr sensitiv und spezifisch mittels diverser *in vitro* - Methoden nachgewiesen werden. In der bakteriologischen Diagnostik finden Methoden wie ELISA, Immunfluoreszenz sowie die Amplifizierung chlamydialer DNA Anwendung. In der Grundlagenforschung werden diese Untersuchungen zumeist *post mortem* durchgeführt und erlauben

keine Charakterisierung des Infektionsverlaufs. Speziell die Infektionsdiagnostik an einem Untersuchungsobjekt zu verschiedenen Zeitpunkten kann dabei nicht realisiert werden. Die PET / CT - Methode jedoch bietet die Möglichkeit wiederholte *in vivo* - Untersuchungen in einer gewünschten zeitlichen Abfolge durchzuführen.

Aufbauend auf den beschriebenen Arbeiten zur Etablierung des Hühnerembryonenmodells an das PET / CT - System (Anästhesie; intravaskuläre Applikation) sollte die *in ovo* - Pathogenese der *Cp. psittaci* - Infektion im natürlichen aviären Wirt untersucht und Rückschlüsse auf die Invasivität gezogen werden. Analog zur Methodik der Antikörpermarkierung zur Radioimmuntherapie von Tumoren wurde ein radioaktiv markierter anti – Chlamydia – LPS - Antikörper zum direkten Nachweis von *Cp. psittaci* eingesetzt. Infolge einer Antikörper – Antigen – Bindung wurde die intraembryonale Lokalisation des Pathogens postuliert. Für die Untersuchung der Verteilung des  $^{89}\text{Zr}$  - markierten Antikörpers in *Cp. psittaci* - infizierten Hühnerembryonen wurden diese am zehnten Bruttag über die CAM infiziert. Die intravaskuläre Applikation des  $^{89}\text{Zr}$  - markierten Antikörpers sowie die PET / CT - Untersuchung erfolgte am sechsten Tag *post infectionem* bei infizierten als auch Mock - infizierten Embryonen.

#### 4.5.1 $^{89}\text{Zr}$ - Markierung eines anti – Chlamydia – LPS - Antikörpers

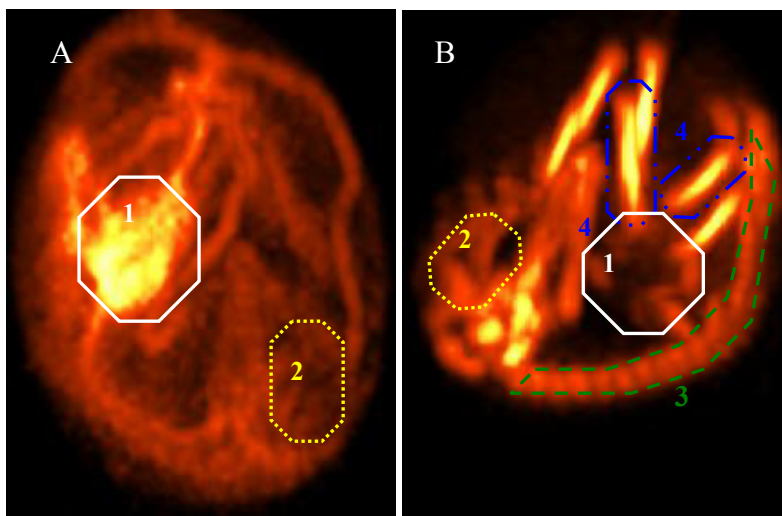
Die Markierung des anti – chlamydia - LPS - Antikörpers wurde zunächst ausgehend von dem Protokoll von Perk *et al.* (2010) für das PET / CT - System etabliert (Kapitel 3.5). Die Angaben des Protokolls zur Reinigung und Elution des  $^{89}\text{Zr}$  - markierten Antikörpers sind auf ein Endvolumen von 1,5 ml ausgerichtet. Bei einer intravaskulären Injektion des Hühnerembryos sollte jedoch das Applikationsvolumen von 0,05 bis 0,1 ml nicht überschritten werden, um einerseits die Ruptur der Gefäße zu verhindern und andererseits physiologische Einflüsse so minimal wie möglich zu halten (Jilani *et al.*, 2003). Zur Realisierung einer kontrastreichen Bildgebung musste der Tracer jedoch in entsprechend hoher Konzentration appliziert werden. Reinigungs- und Elutionsschritte wurden auf kleinere PD25 Säulen übertragen. Die einzusetzenden Volumina für eine maximale Elution des Antikörpers in den jeweiligen Fraktionen wurden anlehnend an die Herstellerangaben experimentell ermittelt und adaptiert. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS - Gel aufgetrennt und somit die Elution des Antikörpers von der Säule überprüft (Kapitel 3.5).

Die von Perk *et al.* (2010) empfohlene, zur Markierung einzusetzende Antikörperkonzentration beträgt 2 - 10 mg. Da kommerziell verfügbare Antikörper jedoch häufig sehr kostenintensiv sind, wurde das Protokoll parallel auf eine Antikörpermenge von 0,7 mg adaptiert. Eine erfolgreiche Markierung des Antikörpers mit  $^{89}\text{Zr}$  konnte trotz divergierender Proteinkonzentrationen gezeigt werden.

#### 4.5.2 Physiologische Aktivitätsverteilung von reinem $^{89}\text{Zr}$ und $^{89}\text{Zr}$ - Antikörper *in ovo* am Beispiel uninfizierter Embryonen

Um unspezifische Akkumulationen des  $^{89}\text{Zr}$  auszuschließen bzw. um sicherzustellen, dass die Akkumulation einer spezifischen Antikörper – Antigen - Interaktion zugrunde liegt anstatt einer unspezifischen Reaktion, wurde die physiologische Verteilung an nicht - infizierten Embryonen untersucht.

Zirkonium ist ein metallisches Element, welches in biologischen Systemen nicht mit spezifischen metabolischen Funktionen in Verbindung gebracht wird. In diesem Sinne ist es weder essentiell noch toxisch. Nach der Applikation wird eine initiale Retention in den Weichteilen und eine nachfolgende, langsame Aufnahme in den Knochen beschrieben (Ghosh *et al.*, 1992).

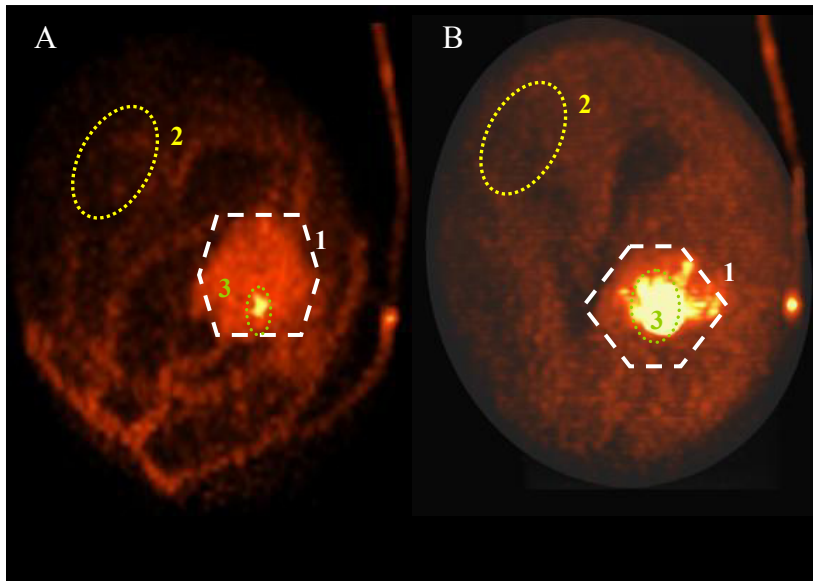


**Abb. 28: Physiologische Verteilung von  $^{89}\text{Zr}$  *in ovo* (Brutttag 16)**

Vergleichende PET - Darstellung eines nicht - infizierten Hühnerembryos 1 h (A) und 20 h (B) nach intravaskulärer Applikation von  $^{89}\text{Zr}$ . Anästhesie mit Isofluran. Tracerakkumulation im Adbomen (1), dem Schädel (2); der Wirbelsäule (3) und den unteren Extremitäten (4) sichtbar. n = 3

Im Rahmen der Untersuchungen zu dem  $^{89}\text{Zr}$  - markierten anti – Chlamydia - Antikörper konnten *in ovo* deutliche Analogien zu dem von Gosh *et al.* (1992) beschriebenem Verteilungsmuster von  $^{89}\text{Zr}$  festgestellt werden. Die PET - Analyse nicht - infizierter Embryonen zeigt eine Stunde nach Applikation eine physiologische Verteilung des Tracers im Abdomen. Anreicherungen im Bereich des Schädels waren sichtbar und bestätigten die in der Literatur beschriebene Passage der Blut – Hirn - Schranke. Bereits 20 Stunden nach Applikation konnte auch die bereits dokumentierte Anreicherung in den Knochen beobachtet werden.





**Abb. 29: Physiologische Verteilung des  $^{89}\text{Zr}$  - markierten anti - Chlamydia - LPS - Antikörpers *in ovo* (Brutttag 16)**

Vergleichende PET - Darstellung eines nicht - infizierten Hühnerembryos 1 h (A) und 20 h (B) nach intravaskulärer Applikation des  $^{89}\text{Zr}$  - markierten anti - Chlamydia - LPS - Antikörpers. Anästhesie mit Isofluran. Tracerakkumulation im Adbomen/ Leber (1), dem Schädel (2) und der Gallenblase (3) sichtbar. n = 3

Die physiologische Verteilung des  $^{89}\text{Zr}$  - markierten anti - Chlamydia - LPS Antikörpers ist in Abbildung 29 dargestellt. Bei einem nicht - infizierten Embryo (Embryo D) akkumulierte der Antikörper deutlich im Abdomen (1). Aufgrund der anatomischen Lage und der Form wurden diese Bereiche der Leber (1) und der Gallenblase (3) zugeordnet. In Versuchen konnte durch Organentnahme und Bohrlochmessungen deren anatomische Einordnung bestätigt werden. Akkumulationen anderer Weichteile des Abdomens (z.B. Darm) konnten aufgrund schwacher Kontrastierung und geringer Anreicherungen nicht eindeutig unterschieden werden. 20 Stunden nach Applikation des Antikörpers waren keine Veränderungen in der Tracerverteilung zu beobachten. Die Gallenblase wies jedoch eine deutlich stärkere Akkumulation auf. Das Fehlen von  $^{89}\text{Zr}$  in den Knochen deutete auf eine hohe *in vivo* - Stabilität des konjugierten Antikörpers hin.

#### 4.5.3 Quantitative Auswertung der $^{89}\text{Zr}$ - Antikörper Akkumulation

Die statische Auswertung und Rekonstruktion (OSEM3D) der PET - Daten erfolgte mit Hilfe der IRW Software 3.0 (*Inveon Research Workplace*) und die Berechnung der % ID / g - Werte wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben. Die ROIs wurden in verschiedenen Schnittebenen eingezeichnet und zu einer Gesamt - ROI eines definierten Volumens interpoliert (Tab. 16). Die anatomische Zuordnung im PET-Bild konnte lediglich bei der Gallenblase deutlich vorgenommen werden. Die Struktur der Leber konnte zwar erkannt werden, eine eindeutige Abgrenzung vom restlichen Abdomen war jedoch nur schwer möglich. Um zu verhindern, dass Anreicherungen anderer abdominaler Weichteile unberücksichtigt blieben bzw. die Struktur der Leber nicht in allen Schnittebenen deutlich detektiert werden konnte, dehnte sich die eingezeichnete ROI über nahezu den gesamten Bauchraum des Embryos aus. Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit der einzelnen Untersuchungsobjekte wurde das Volumen der ROIs immer gleich gewählt und positioniert.

**Tab. 16: Volumina der ROI-Strukturen für Embryonen an Bruttag 16**

Organ	Volumen (nach 1h)	Volumen (nach 20 h)
Gallenblase	~ 10 mm <sup>3</sup>	~ 75 mm <sup>3</sup>
Leber / Abdomen	~ 1050 mm <sup>3</sup>	~ 1050 mm <sup>3</sup>

In Übereinstimmung mit den PET - Untersuchungen konnte 20 h nach Injektion des Tracers eine Steigerung der Aktivität innerhalb der Gallenblase festgestellt werden. Folgend wurde das zur Auswertung betrachtete Volumen der ROI erhöht. Die ermittelten injizierten Dosen pro Gamm Gewebe der <sup>89</sup>Zr – Antikörper - Verteilung 1 h und 20 h nach Applikation in uninfizierten Embryonen sind den Tabellen 17 und 18 zu entnehmen. Zu beiden gemessenen Zeitpunkten waren deutliche Akkumulationen im Bereich der Gallenblase zu verzeichnen. Embryo C wurde, verglichen mit den anderen drei Kontrollen, eine höhere Ausgangsaktivität appliziert. Dies kann die Ursache für eine im Vergleich gesteigerte Akkumulation des Tracers in der Gallenblase sein. Da der <sup>89</sup>Zr - markierte Antikörper im Embryo vermutlich als nicht aviäre Struktur erkannt wird und keine physiologische Funktion erfüllt, wird dieser mit dem Blut in die Leber und von dort in die Gallenblase transportiert. Über Stoffwechselwege von *in ovo* - inkorporierten Proteinen an Entwicklungstag 16 konnten in der Literatur keine Angaben gefunden werden. Embryonen, denen vergleichbare Tracermengen appliziert wurden, zeigten homogene Anreicherungswerte in Gallenblase und Leber. Nach 20 Stunden konnte kein freies Zirkonium, erkennbar an der fehlenden Einlagerung in den Knochen, nachgewiesen werden. Dies spricht für eine hohe metabolische Stabilität des markierten Antikörpers. Gesteigerte Akkumulationen konnten ebenfalls in der Gallenblase beobachtet werden, was für eine weitere Umverteilung und Einlagerung des Tracers spricht.

**Tab. 17: <sup>89</sup>Zr – Antikörper - Aktivität nicht - infizierter Embryonen in % ID / g 1 Stunde nach Applikation an Bruttag 16**

<sup>89</sup> Zr – Antikörper - Aktivität in % ID / g (korrigiert)	Embryo A	Embryo B	Embryo C	Embryo D
Ei	1,80	1,63	2,18	1,72
Gallenblase	37,37	34,51	50,82	33,86
Abdomen / Leber	14,32	16,26	23,29	16,27

**Tab. 18: <sup>89</sup>Zr – Antikörper - Aktivität nicht - infizierter Embryonen in % ID / g 20 Stunden nach Applikation an Bruttag 16**

<sup>89</sup> Zr – Antikörper - Aktivität in % ID / g (korrigiert)	Embryo A	Embryo B	Embryo C	Embryo D
Ei	1,54	1,53	1,90	1,36
Gallenblase	75,53	71,18	79,91	67,89
Abdomen/ Leber	14,78	17,45	16,61	13,41

Die injizierten Dosen pro Gramm Gewebe (% ID / g) beider Untersuchungszeitpunkte der infizierten Embryonen sind in den Tabellen 19 und 20 dargestellt. Evidente Unterschiede zum physiologisch verteilten  $^{89}\text{Zr}$  - markierten Antikörper (siehe uninfizierte Embryonen) konnten nicht festgestellt werden. Ebenso besteht ein Zusammenhang zwischen der Akkumulationsquantität der Gallenblase und der applizierter Tarcerkonzentration. Exemplarisch kann dies an Embryo F verdeutlicht werden. Diesem Untersuchungsobjekt wurde die höchste Aktivitätsmenge des Tracers intravaskulär appliziert, was sich in deutlichen Akkumulationen der Gallenblase und der Leber ausdrückte. Auch die Verteilung des Tracers zum zweiten Zeitpunkt der Untersuchung entsprach dem der nicht - infizierten Kontrollembryonen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass keine pathologisch bedingte Akkumulation infolge einer Antigen – Antikörper - Interaktion vorlag.

**Tab. 19:  $^{89}\text{Zr}$  – Antikörper - Aktivität *Cp. psittaci* infizierter Embryonen in % ID / g 1 Stunde nach Applikation an Brutttag 16**

$^{89}\text{Zr}$ – Antikörper - Aktivität in % ID/g (korrigiert)	Embryo E	Embryo F	Embryo G	Embryo H
Ei	3,16	4,43	2,88	1,68
Gallenblase	40,52	56,19	39,93	27,66
Abdomen / Leber	24,91	37,25	22,88	13,82

**Tab. 20:  $^{89}\text{Zr}$ -Antikörper-Aktivität *Cp. psittaci* infizierter Embryonen in %ID/g 20 Stunden nach Applikation an Brutttag 16**

$^{89}\text{Zr}$ – Antikörper -Aktivität in % ID/g (korrigiert)	Embryo E	Embryo F	Embryo G	Embryo H
Ei	2,92	4,13	2,52	1,57
Gallenblase	84,50	95,73	23,27	59,36
Abdomen / Leber	18,28	23,90	13,45	12,84



## 5. Diskussion

Das Hühnerembryonenmodell ist ein etabliertes System, dessen besondere Bedeutung für die Forschung in der mannigfaltigen Anwendungsmöglichkeit zu sehen ist. So wird das Hühnerembryonenmodell unter anderem zur Charakterisierung von Wirt – Pathogen - Interaktionen eingesetzt. Die untersuchten Erreger sind hierbei Viren, Pilze und Bakterien. In der Literatur beschriebene Wechselwirkungen zwischen Wirt und Pathogen beschreiben Erkenntnisse aus *in vitro* - bzw. *in vivo* - Experimenten die mit dem CAM - Modell bzw. *in ovo* gewonnen wurden. Die exakte Lokalisation des Erregers im dreidimensionalen Kontext des Wirtssystems, kann jedoch mit molekularbiologischen Methoden als auch mikroskopischer Bildgebung allein nicht gezeigt werden. Aufschlüsse über die Penetration bzw. Verteilung von Erregern im Wirt könnten mittels molekularer Bildgebungstechniken wie PET / CT gewonnen werden. An Mausmodellen aber auch im humanmedizinischen Bereich konnten bereits diverse Fragestellungen mit Hilfe der PET / CT - Methode beantwortet werden und stellen eine starke Bereicherung im Forschungs- als auch Klinikalltag dar. Genannte Gründe motivierten die Anwendung der PET / CT - Methode auf das Hühnerembryonenmodell. Bereits beschriebene Anwendungen des Hühnermodells (siehe Einleitung) können in einem neuem Kontext betrachtet werden und zur Bearbeitung von neuen Fragestellungen beitragen.

### 5.1. Anästhesie von Hühnerembryonen

Für die molekulare Bildgebung des *in ovo* - Systems Hühnerembryo werden anästhetische Maßnahmen vorausgesetzt. Das Ziel der Arbeit war die Einführung eines Narkotikums zur reversiblen Immobilisierung von Hühnerembryonen *in ovo* als Voraussetzung für eine bewegungsartefaktfreie PET / CT - Untersuchung. Da Hühnerembryonen als *in ovo* - Modell in der molekularen Bildgebung noch keinen Einzug gehalten haben, sind in der einschlägigen Literatur nur wenige Studienergebnisse zur systematischen Anwendung von Anästhetika an Hühnerembryonen beschrieben. Der Fokus der Literatur liegt auf der Narkose adulter Tiere. Das Anwendungsprofil der zu etablierenden anästhetischen Maßnahmen im Rahmen dieser Arbeit lag auf der Immobilisierung von Embryonen an verschiedenen Entwicklungstagen (ELT 10 bis 18) ohne besondere Beeinflussung der Vitalität.

Vor dem Hintergrund langer Aufnahme-modalitäten während der PET / CT - Messung, gerade für kinetische Fragestellungen, wurde in einer ersten Serie von Experimenten mit den Langzeitanästhetika Urethan und  $\alpha$  - Chloralose (UC-Anästhesie) gearbeitet. Urethan ist ein tierexperimentell sehr häufig genutztes Injektionsnarkotikum, dessen sedierende, analgesierende Wirkung auf einer unterschiedlich starken Beeinflussung multipler Neurotransmittersysteme (z. B.: cholinerge Nicotinrezeptoren; GABA- und Glycinrezeptoren) beruht (Hara & Harris, 2002). Urethan wird häufig in Kombination mit  $\alpha$  - Chloralose genutzt, da es dessen Löslichkeit deutlich erhöht. Beide Substanzen erzeugen lang anhaltende Zustände der Narkose und zeigen nur minimale physiologische Effekte. Durch die kombinierte Anwendung beider Anästhetika an 16 Tage alten

Hühnerembryonen konnte bereits Sugijama *et al.* (1996) deren Bewegung reduzieren und die Wirksamkeit der Narkotika an benanntem Modellsystem bestätigen. Aufbauend auf genannter Arbeit wurde das Protokoll zur UC - Anästhesie auf das Anforderungsprofil der artefaktfreien, molekularen Bildgebung von Hühnerembryonen mittels PET / CT übertragen. Die Anwendbarkeit des UC - Gemischs wurde an Embryonen verschiedener Entwicklungszustände (ELT 10 bis 18) untersucht und geeignete Dosierungen zur Immobilisierung ermittelt (Kapitel 4.1.2.1). Die zielführende Anwendung der Narkotika konnte mittels CT anhand kontrastreicher Bildgebung bestätigt werden.

Neben der Wirksamkeit der Anästhesie und der artefaktfreien Datenerhebung sollte in die Bewertung des Narkotikums auch der Einfluss auf die Mortalität einbezogen werden. Vor dem Hintergrund wiederholender Messungen ein und desselben Untersuchungsobjektes sowie der Reduzierung von Tierzahlen, wird diesem Kriterium eine ganz besondere Bedeutung beigemessen. Die genannten Ziele konnten vor allem zu frühen Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung (ELT 10 bis 13) nicht eingehalten werden. Hohe Letalitätsraten konnten selbst durch vorsichtige, stufenweise Adaptation nicht vermieden werden. Innerhalb des Narkoseregimes war der Toleranzbereich sehr schmal, sodass die Spanne zwischen dem Absterben der Embryonen und zu flacher Narkosen sehr eng beieinander lag. Zu diskutieren ist in diesem Zusammenhang die individuelle Wirkung der einzelnen Anästhetika als mögliche Ursache für die hohen Letalitäten.

Urethan wird seit 1885 als Narkosesubstanz in diversen physiologischen und pharmakologischen Experimenten eingesetzt (Altura & Weinberg, 1979). Jahrzehntelange Erfahrungen mit diesem Anästhetikum sind sicher auch ursächlich für den aktuell noch breiten Einsatz. Hara & Harris (2002) berichten von mehr als 100 jährlichen neuen Studien, in denen Urethan zur Anästhesie von Versuchstieren verwendet wird. Immanente Bedeutung wird der Applikation über diverse parenterale Routen beigemessen. Von großem Vorteil werden die minimalen kardialen und respiratorischen Effekte sowie geringe Auswirkungen auf das autonome und kardiovaskuläre System gesehen (Jong *et al.*, 2002). Dennoch wird in einigen Ländern die Anwendung von Urethan in Überlebensstudien wegen des karzinogenen Potentials für Mensch und Tier unterbunden. In Mäusen konnten pulmonäre Adenome zu frühen Zeitpunkten der Entwicklung in Folge von Urethan - Behandlungen nachgewiesen werden. In neonatalen Mäusen wurde ein starker karzinogener Einfluss sowie der transplazentale Transport belegt. Karzinogene Effekte sind möglicherweise auf intermediäre, im Blut zirkulierende Abbauprodukte von Urethan zurückzuführen (Field & Lang, 1988). Für Urethan sind zudem variable „individuelle“ Narkoseausprägungen bei gleicher Dosierung abhängig von Alter, Geschlecht, Muskelmasse und Genotyp beschrieben (Arras *et al.*, 2010). In Kombination mit  $\alpha$  - Chloralose eingesetzt, verbessert Urethan dessen Löslichkeit und verstärkt dessen geringe analgetische sowie sedierende Wirkung. Auch bei  $\alpha$  - Chloralose ist der Vorteil in der minimalen kardiopulmonären Depression zu sehen. Allein findet dieses Narkotikum, aufgrund der minimalen Analgesie, jedoch nur bei schmerzfreien Anwendungen Einsatz. Auch bei  $\alpha$  - Chloralose wird empfohlen, falls möglich auf vorhandene Alternativen zurückzugreifen. Die kombinierte

Anwendung beider Narkotika wird in der Literatur übereinstimmend auf die Durchführung basaler Narkosen in nicht - Überlebensversuchen reduziert, was in oben aufgeführten Nachteilen begründet liegt.

In wie weit die im Schrifttum genannten Beobachtungen auf das *in ovo* - System übertragbar sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht explizit betrachtet. Die bewegungsfreie Darstellung der Hühnerembryonen mittels PET / CT stand im Fokus der Untersuchungen und konnte gezeigt werden. Die hohen Letalitätsraten gerade zu frühen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung lassen aber Rückschlüsse auf toxische Einflüsse zu. Welches der beiden Narkotika oder ob die Kombination beider Substanzen zu den hohen Mortalitätsraten vor allem an ELT 10 bis 13 führte wurde nicht verfolgt. Aufgrund der genannten Nachteile von Urethan als auch  $\alpha$  - Chloralose wären derartige Untersuchungen wenig zielführend. Der in der Literatur genannten Empfehlung, beide Anästhetika lediglich bei nicht - Überlebensversuchen einzusetzen, kann vor allem zu frühen Stadien der Embryonalentwicklung zugestimmt werden. Dem Anspruch, Hühnerembryonen wiederholt mittels molekularer Bildgebung darzustellen, kann durch die Anwendung der UC - Anästhesie nicht gerecht werden, da von toxischen Einflüssen auszugehen ist. Effekte auf die Embryonalentwicklung können nicht ausgeschlossen werden und bedingen weiterführende Studien im Rahmen dieser Problematik.

Zu späteren Zeitpunkten der Embryonalentwicklung (ELT 15 bis 18) scheint das Modellsystem weniger empfindlich zu sein, was sich in gesteigerten Überlebensraten ausdrückt. Organschädigende Einflüsse infolge der Anästhesie wurden nicht untersucht. Da die Überlebensrate 24 Stunden nach Injektion beurteilt wurde, können keine Aussagen zur Letalität zu späteren Zeitpunkten getroffen werden. Aufbauend auf den Angaben der Literatur wird den Empfehlungen, falls möglich auf andere Narkotika auszuweichen, zugestimmt.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die UC - Anästhesie eine Möglichkeit zur Immobilisierung von Hühnerembryonen darstellt und wesentlich zur artefaktfreien Bildgebung mittels PET / CT beiträgt. Hohe Mortalitätsraten unterstreichen aber die Anwendung speziell zu späteren Zeitpunkten der Embryonalentwicklung oder für Versuche, deren zentrales Anliegen nicht im Überleben der Embryonen zu sehen ist.

Analoge Untersuchungen zur Immobilisierung von Hühnerembryonen verschiedener Entwicklungsstadien (ELT 10 bis 18) wurden additiv mit dem Kurzzeitanästhetikum 2,2,2 - Tribromethanol (Avertin) durchgeführt. In der einschlägigen Literatur konnten jedoch keine Hinweise auf dessen Anwendung zur Narkotisierung von Hühnerembryonen *in ovo* gefunden werden. Lediglich die Narkose von Nagern, vor allem Mäusen, ist gut beschrieben. Avertin ist ein attraktives Anästhetikum, da es einfach und kostengünstig herzustellen ist und für dessen Anwendung keine spezielle Laborausstattung notwendig ist. Hauptsächlich intraperitoneal appliziert, erfolgt eine schnelle, kurzzeitige Sedierung der Untersuchungsobjekte.

Aufbauend auf der Arbeit von Papaioannou *et al.* (1993) wurden diverse Parameter zur Immobilisierung von Hühnerembryonen, wie die Effizienz der Narkose, das Überleben der Embryonen

sowie Dauer und Tiefe der Narkose untersucht und bewertet. Anhand artefaktfreier CT - Bilder konnte die Wirksamkeit von Avertin *in ovo* belegt werden. Sofern das Überleben der untersuchten Embryonen von Bedeutung ist, sollte die Anwendung von Avertin auf den 11. bis 18. Entwicklungstag beschränkt werden. Keiner der Embryonen vom zehnten Entwicklungstag hat die Anästhesie überlebt, wobei toxische Nebeneffekte nicht ausgeschlossen werden können. In der Literatur wurden pathologische Veränderungen bereits 24 h nach Injektion beschrieben (Arras, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch keine nachstehende Befundsdiagnostik zur Mortalität der Embryonen durchgeführt. Kontrovers diskutiert wird in diesem Zusammenhang die fehlende Standardisierung der Zusammensetzung, Herstellung und Lagerung der Tribromethanol - Lösung. In der Anwendung dieser pharmakologisch und toxikologisch nicht getesteten Substanz werden häufig die Ursachen fataler Nebenwirkungen, wie Peritonitis und hoher Mortalitätsraten gesehen (Arras, 2007). Mikrobielle Kontaminationen können durch Sterilfiltration des Anästhetikums vor Anwendung weitestgehend ausgeschlossen werden.

Ein zentraler Vorteil der molekularen Bildgebung mittels PET / CT ist in der wiederholten Untersuchung ein und desselben Objekts zu sehen. Voraussetzung hierfür liegt in der mehrfachen Anwendung eines geeigneten Anästhetikums, was bei Avertin nicht möglich ist. Bereits bei Mäusen wurden infolge mehrmaliger Avertin - Injektionen gesteigerte Mortalitätsraten beobachtet. Diese Aussage kann sehr wahrscheinlich auch auf das embryonale System des Hühnereies übertragen werden. Untersuchungen diesbezüglich wurden nicht durchgeführt und vor dem Hintergrund einer mangelnden Standardisierung der Avertin - Narkose sowie aufgeführter Nebenwirkungen als wenig gewinnbringend eingestuft.

Grundsätzlich bleibt festzuhalten, dass Avertin zur Generierung artefaktfreier Bilder *in ovo* eingesetzt werden kann, wiederholende Applikationen aber aus genannten Gründen ausgeschlossen werden sollten. Durch mangelnde Richtlinien zum Umgang mit Avertin ist dessen Anwendung nicht empfehlenswert, sodass alternativen Anästhetika auch beim Hühnerembryo Vorzug gegeben werden sollte.

Alternativ zu den genannten Injektionsnarkotika Urethan,  $\alpha$  - Chloralose und Avertin wurde folgend die Anwendbarkeit des Inhalationsnarkotikums Isofluran am Hühnerembryonenmodell untersucht. Isofluran ist ein volatiles Anästhetikum, dessen Aufnahme durch Diffusion über die Alveolarmembran in das Blut und die Gewebe erfolgt (Löschner, 2006; Erhardt *et al.*, 2004). Seit 1984 in Gebrauch, findet es vor allem in der Veterinärmedizin breiten Einsatz. Isofluran zeichnet sich durch eine gute hypnotische und muskelrelaxierende Wirkung aus, induziert aber lediglich einen schwach analgetischen Zustand. Unter der Maßgabe Embryonen artefaktfrei darzustellen, ohne Schmerz - induzierende Eingriffe am Modellsystem vorzunehmen, kann auf stark analgesierende Eigenschaften des Narkotikums verzichtet werden.

Aufbauend auf der Arbeit von Wojtczak (2000) wurden embryonierte Hühnereier in einer mit Isofluran gefluteten Narkosekammer inkubiert und die Einwirkungsdauer zur Erzeugung

kontrastreicher CT - Bilder ermittelt (Kapitel 4.1.2.3). Der Einfluss des Anästhetikums auf das Überleben der Embryonen wurde an Entwicklungstag 10 bis 18 untersucht. Isofluran erwies sich als besonders geeignetes Anästhetikum zur Immobilisierung der Embryonen, denn neben der Unterdrückung der Willkürmotorik wurden nur sehr geringe Mortalitätsraten festgestellt. Lediglich bei einem Embryo von Entwicklungstag 10 konnte nach 24 Stunden keine Vitalität festgestellt werden. Die Toleranz der Embryonen gegenüber Isofluran ist also sehr hoch, was in den geringen Kontraindikationen begründet liegt. Vor allem werden kardiovaskuläre Depressionen als auch Atemdepressionen als Nebenwirkungen beschrieben. Durch kontrollierte Beatmung des Versuchstiers kann letzterem Punkt relativ gut entgegen gewirkt werden. Im Fall der Hühnerembryonen erfolgt die Absorption des vaporisierten Gases zunächst über die Kalkschale, welche beim Hühnerei von 10000 bis 12000 Poren durchsetzt ist. Über die Gefäße der CAM, welche *in ovo* für den Gasaustausch mit der Umwelt verantwortlich sind, tritt Isofluran in die Blutbahn des Embryos über. In diesem Zusammenhang wird die gute Verträglichkeit des Narkosegases gesehen. Durch die Anzahl der Poren der Eischale wird der Gasaustausch mit der Umwelt reguliert. Hohen Konzentrationen durch eine Bolusinjektion, wie bei der Verabreichung fester oder flüssiger Narkotika, wird somit entgegengewirkt. Lediglich über höhere Volumenanteile und ein längeres zeitliches Fenster der Inkubation kann die anflutende Menge intraembryonal gesteigert werden. Innerhalb der Versuchsreihe mussten Embryonen späterer Entwicklungstage zur gewünschten Reduktion der Motorik dem Narkosegas über längere Zeiträume ausgesetzt werden, was die oben genannte Hypothese über die Aufnahme des gasförmigen Anästhetikums unterstreicht.

Infolge der Resorption des Narkosegases Isofluran über die Eischale ergibt sich ein weiterer entscheidender Vorteil. Anästhesie vorbereitende Maßnahmen, wie das Bohren von Löchern oder das Absenken der CAM werden unnötig. Neben dem zeitlichen Aspekt ist vor allem der nicht - invasive Umgang mit den Embryonen entscheidend. Zudem können mögliche bakterielle Infektionen, die bei der Applikation von Injektionsnarkotika nicht zu vernachlässigen sind, ausgeschlossen werden.

Initiale Versuche zur Ermittlung der Einwirkdauer von Isofluran wurden mit Hilfe einer Narkosekammer durchgeführt. Die anästhesierten Embryonen wurden nachfolgend zur CT - Messung auf das Bett des PET / CT – Systems aufgebracht. Speziell für die Analyse dynamischer Prozesse ist aber die lückenlose Immobilisierung der Embryonen über lange Zeiträume hinweg essentiell. Vor diesem Hintergrund wurde die Isoflurannarkose in ihrem Ablauf optimiert. Einleitend wurde die Anästhesie in der dafür vorgesehenen Kammer durchgeführt. Innerhalb des PET / CT - Gerätes wurde die Narkose während der Messung aufrechterhalten, indem die Eier in eine selbst hergestellte „Kammer“ überführt wurden. In einer Kunststofftüte, welche mit einem Zustrom für Isofluran / Sauerstoff versehen war, konnte der Narkosezustand aufrechterhalten werden. Aufgrund der erfolgreichen Etablierung der routinemäßigen Isoflurannarkose, können Langzeitmessungen, ohne auf kontrastreiche CT - Bilder zu verzichten, durchgeführt werden.

Verglichen mit Avertin und der UC - Anästhesie, stellt Isofluran das optimale Narkotikum zur Anästhesie *in ovo* dar. Durch die hohe Toleranz der Embryonen sowie die rasche Elimination von Isofluran konnten sogar mehrfache Narkosen durchgeführt werden, ohne das Überleben der Embryonen negativ zu beeinflussen. Das zentrale Anliegen wiederholender *in ovo* – PET / CT - Messungen von Hühnerembryonen konnte somit artefaktfrei realisiert werden.

## 5.2 Adaption der intravaskulären Applikation an das PET / CT - System

Für die molekulare Bildgebung werden Tracer routinemäßig am Menschen aber auch in der Kleintierbildgebung intravaskulär appliziert. *In ovo* jedoch stand die standardisierte Etablierung einer geeigneten Route zur Applikation von Kontrastmitteln bzw. Radiotracern noch aus.

Die intravaskuläre Applikation am Hühnerembryo erfolgt üblicherweise mittels Mikroinjektionstechnik. Durch die räumlichen Einschränkungen innerhalb des PET / CT - Gerätes konnte diese Methodik nicht angewendet werden. Die Herstellung eines geeigneten Kathetersystems analog Tazawa (1981) erfolgte und machte die Anschaffung kostenintensiver Manipulationsgeräte überflüssig. Das Kathetersystem ist kostengünstig, einfach in der Herstellung und erlaubt die Adaptierung an gegebene Messbedingungen. Variable Schlauchlängen sowie die Kombination mit 3 – Wege – Hahn - Systemen stellen eine mögliche Erweiterung des Anwendungsspektrums dar. Tazawa (1981) zeigte die Anwendung des Kathetersystems an 13 bis 17 Tage alten Hühnerembryonen. Durch die Verwendung extrem feiner 30G - Kanülen konnte das System darüber hinaus bereits an Embryonen von Entwicklungstag 10 erfolgreich angewendet werden.

Multiple intravasale Applikationen von Tracern im Rahmen vergleichender Langzeitstudien bedingen das Verweilen des Kathetersystems im embryonalen Blutgefäß. Vorzeitiges Entfernen des Katheters birgt zudem das Risiko des Nachblutens im Bereich der Punktionsstelle, was je nach Grad, als Ursache für das Absterben des Embryos diskutiert werden kann. Zudem kann infolge des Blutaustritts auch bereits applizierter Tracer aus dem Gefäß austreten und dessen Disseminierung nach pathologischen, physiologischen oder artifiziellen Zuständen verfälschen.

Kathetermaterial, Katheterdesign sowie mechanische Eigenschaften stellen Ursachen für Komplikationen im Rahmen der Tracerapplikation dar. Gesteigerte Letalitäten als mögliche Komplikation wurden jedoch im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen nicht festgestellt. Die Nadel des Katheters stellt trotzallem einen Fremdkörper dar, dessen mögliche Einflüsse auf das embryonale System nicht unterschätzt werden dürfen. Entzündungsreaktionen, Thrombenbildung und Infektionen stellen in der Literatur beschriebene Komplikationen dar. Unverträglichkeitsreaktionen auf das Material wurden im Rahmen der durchgeführten Maßnahmen zur Vitalitätsbewertung jedoch nicht festgestellt. Experimentelle Untersuchung zur Klärung des Toxizitätsprofils stehen in diesem Zusammenhang noch aus. Ebenso sollte in weiterführenden Versuchen geklärt werden, ob entwicklungsbiologische Veränderungen infolge des Kathetersystems vorliegen.

Periphere Verweilkatheter finden in der Humanmedizin häufig Anwendung, um wiederholende Einstiche am Patienten zu umgehen. Nach erfolgreicher Punktion des Gefäßes wird der Stahl - Mandrin entfernt und der flexible Kunststoffkatheter verbleibt im Gefäß. Gefäßverletzungen durch die Stahlkanüle, vor allem bei längerfristigem Zugang zum Gefäßsystem, werden verhindert. Vor dem Hintergrund physiologische Reaktionen infolge des Metallkatheters zu unterbinden, wurde auch diese Applikationsvariante in Betracht gezogen. Problematisch stellte sich jedoch der käufliche Erwerb sehr kleiner Katheterdurchmesser heraus, wodurch dieses System *in ovo* praktisch nicht zur Anwendung gebracht werden konnte. Gleiches galt für die kommerziell zu erwerbenden Flügelkanülen, welche den Vorteil eines bereits integrierten Schlauches aufweisen. Gefäßirritationen infolge von Manipulationen am Luer - Lock werden weitestgehend vermieden und prädestinierten deren Anwendung für sehr kleine, fragile Gefäße. Hierbei stellte sich jedoch der lange, großvolumige Schlauch als ungeeignet heraus, da er ein zu hohes Totvolumen (Tracer) bedingt. Durch die Einführung des selbst hergestellten Kathetersystems, konnten die genannten Nachteile kommerzieller Produkte überwunden werden. Zudem konnte am Beispiel von [ $^{18}\text{F}$ ] - Fluorid die wiederholte Tracer - Applikation gezeigt und die Entwicklungsphysiologie des Knochenwachstums im PET - Bild dargestellt werden. Zu diskutieren bleibt in diesem Zusammenhang die Frage nach eventuellen Einflüssen auf die Embryonalentwicklung infolge wiederholender Applikationen des Tracers. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch diesbezüglich keine weiteren experimentellen Untersuchungen durchgeführt.

In der Literatur beschriebene Mikroinjektionstechniken *in ovo* gehen häufig von einer vollständigen Öffnung des Eies am stumpfen Pol aus. Durch die beschriebene Entfernung der Kalkschale (Kapitel 3.2.6), ohne die darunter befindliche Schalenhaut zu verletzen, bleibt das zu punktierende Gefäß jedoch stabil. Durch diese natürliche Fixierung kann das Einführen des Katheters effektiv an der seitlichen Position des Eies vorgenommen werden und macht horizontales Bebrüten der Eier überflüssig. Zudem stellt das nur teilweise Öffnen des Eies einen zusätzlichen Schutz vor Umwelteinflüssen, Austrocknung und Infektionen dar. Empfehlenswert ist die Methode der seitlichen intravasalen Gefäßpunktion, wenn die CAM in abgesenkter Form vorliegt. Initial vorgenommene Infektionen der Hühnerembryonen über die CAM können nachstehend mittels molekularer Bildgebung untersucht werden, da eine zusätzliche Applikation von Tracern erfolgreich vorgenommen werden kann.

Mit Hilfe der intravaskulären Applikation können diverse, hochmolekulare Substanzen intravaskulär appliziert werden sowie Aussagen zur Biostabilität und Embryotoxizität getroffen werden. Diese Methode ist eine Alternative zur Applikation über die CAM, die eine natürliche Barriere darstellt. Die Optimierung des Kathetersystems im Rahmen der Einführung einer Glasnadel ermöglicht zudem eine kontrastreichere CT - Bildgebung sowie die Anwendung für Magnetresonanzuntersuchungen. Metallinduzierte Artefakte können somit ausgeschlossen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Applikationen des Tracers manuell vorgenommen. Zur Synchronisation der Abläufe könnte die automatisierte Applikation über Spritzenpumpen vorgenommen werden. Die Etablierung eines solchen Systems steht aus.

### 5.3. Adaption des *Cp. psittaci* – *in vitro* - Infektionsmodells an das LigandTracer® - System

Das LigandTracer® - System ist eine einfache und robuste technische Erweiterung, dessen Innovation in der Echtzeit - Darstellung molekularer Interaktionen zu sehen ist. Vergleichend wird die Wechselwirkung des radioaktiv markierten Tracers in einem aktiven Bereich (eingesäte Zelle) und einem *in situ* - Referenzbereich innerhalb einer Zellkulturplatte dargestellt. Die Position des Detektors oberhalb der Zellkultur, stellt das Auslesen des interagierenden Zielmoleküls sicher. Umfangreiche Einsatzmöglichkeiten dieses Systems konnten in diversen Versuchen gezeigt werden. Vergleichende Untersuchungen verschiedener Zelllinien, die Darstellung von Protein – Protein - Interaktionen sowie die Detektion radioaktiv markierter Antikörper gehören ebenso zu den multiplen Anwendungsgebieten wie die Durchführung von zellbasierten Überlebensstudien (Bjorke & Andersson, 2006) und die Darstellung des Glukosemetabolismus durch Verwendung des Analogons [<sup>18</sup>F] - FDG (*Technical Notes Ridgeview Instruments*). Die einfache Handhabung, der minimale Bedarf an radioaktiv einzusetzendem Tracer sowie die zeitsparende Arbeitsweise prädestinieren das System zu erweiterten Anwendungen. Aufbauend auf den Herstellerangaben erfolgte die Adaptierung des *Cp. psittaci* - *in vitro* - Infektionsmodells an das LigandTracer® - System. Parameter wie die Temperatur, der Versuchsablauf sowie die Infektionsdosen wurden aufbauend auf den Herstellerangaben modifiziert und erfolgreich angewendet.

Reaktionen innerhalb von Zellen werden von der Temperatur beeinflusst. Vorhersagen über das Wachstum bei veränderten Temperaturen sind schwierig und müssen für die jeweilige Zelllinie untersucht werden. Bei Säugerzellen wird die Kultivierungstemperatur jedoch in der Regel konstant bei +37 °C gehalten, da Abweichungen von dieser „physiologischen“ Temperatur mit negativen Einflüssen auf das Wachstum der Kultivierungen in Verbindung gebracht werden. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Adaptierungsversuche die am Gerät grundeingestellte Temperatur von +25 °C auf +37 °C erhöht. Gerade zur Studie von zellulären Interaktions- und Aufnahmeprozessen sind physiologische Messbedingungen essentiell. Damit einhergehende gesteigerte Verdunstungsraten des Lösungsansatzes konnten im Rahmen der relativ kurzen Datenaufnahmezeiten nicht beobachtet werden. Bei Langzeitstudien kann die genannte Komponente jedoch entscheidenden Einfluss haben und sollte im Vorfeld experimentell untersucht werden. Abhilfe kann durch den Transfer des Messaufbaus von der *Laminar Flow* in den Brutschrank geschaffen werden. Im Rahmen infektionsbiologischer L2 - Untersuchungen wurde von diesen Maßnahmen jedoch abgesehen. Da der Messablauf das Arbeiten mit der geöffneten Petrischale vorsieht, wurde die Infektionsgefahr für die experimentierende Person als zu hoch eingestuft.



Innerhalb genannter Adaptierungsversuche zur Temperatur wurde die verzögerte Temperatureinstellung im System jedoch kritisch bewertet. Erst nach Beginn der Datenaufnahme stellte sich die angegebene Zieltemperatur ein. Völlig übereinstimmende Temperaturprofile in adäquaten Versuchen konnten nicht gewährleistet werden. Durch die Einführung eines 30 - minütigen Vorlaufs äquilibrierte sich die Messtemperatur auf +37 °C, bevor der Tracer zugegeben und mit der Datenerhebung begonnen wurde. Abweichungen von der „physiologischen“ Temperatur konnten somit umgangen werden. Ferner kann der Vorlauf als additiver Waschschrift zur 1 x PBS – Puffer - Behandlung der Zellen betrachtet werden. Die rückstandsfreie Eliminierung von Glukose (DMEM - Kulturmedium; *high glucose*) ist zur Darstellung der [<sup>18</sup>F] – FDG - Akkumulationen in Zellen von zentraler Bedeutung. Eventuellen Beeinflussungen der generierten Daten infolge von unzureichend entfernter Glukose kann somit entgegengewirkt werden.

In der Diskussion zur Methodik sollte außerdem bemerkt werden, dass dem DMEM - Kulturmedium, aber auch dem DMEM - Versuchsmedium ohne Glukose, fetales Kälberserum (FKS) zugesetzt wurde. Bei der Kultivierung spielt FKS sowohl für die Bereitstellung von Wachstumsfaktoren als auch der Erhöhung der Resistenz von Scherkräften eine entscheidende Rolle. Demgegenüber ist das Serum jedoch chemisch nicht definiert und nicht autoklavierbar. Der Serumglukosegehalt wurde im Rahmen durchgeführter Arbeiten nicht explizit bestimmt, insofern FKS der gleichen Charge verwendet wurde. Kommt es zu diesbezüglichen Abweichungen, sollte eine vorgelagerte Feststellung des Glukosegehalts in die Versuchsplanung einbezogen oder über das Unterlassen der FKS - Zugabe nachgedacht werden. Mögliche Fehlerquellen durch abweichende Serumglukosetiter könnten somit ausgeschlossen werden.

In der Literatur werden offene Kulturbedingungen durch die Verwendung von Petrischalen zumeist mit höheren Kontaminationsgefahren und möglichen physiologischen Einflüssen für die Zellen in Verbindung gebracht. Kontrollierte Bedingungen konnten sichergestellt werden, indem ein und derselbe Brutschrank für alle diese Versuche eingesetzt wurde. Einflüssen wie Temperaturänderung, gesteigerte Verdunstung und damit verbundene pH - Änderungen infolge wiederholten Öffnens des Brutschranks konnte entgegengewirkt werden. Entgegen den Herstellerangaben wurde das Volumen des Kulturmediums in der Petrischale auf 10 ml erhöht, wodurch möglichen nachteiligen Verdunstungseffekten ebenfalls entgegnet wurde. Eine gesteigerte Anfälligkeit des Systems für Kontaminationen konnte im Rahmen der durchgeführten Versuche nicht festgestellt werden.

Die Adhäsion von Zellen und deren Vermehrung auf dem Träger ist essentielle Grundlage für *in vitro* - Arbeiten mit dem LigandTracer® - System. Prinzipiell problematisch in der Anwendung der Methodik sind Arbeiten mit unzureichend adhärierten Zellen zu sehen. Ablösungsprozesse durch das Zupipettieren von PBS, Kulturmedium und Tracer stellen kritische Arbeitsschritte dar und sollten mit äußerster Sorgfalt vorgenommen werden. Die in den Versuchen verwendeten BGM - Zellen erwiesen sich jedoch als sehr robust gegenüber den genannten mechanischen Einflüssen und hielten zudem den

Rotationsschritten während der Messung stand. Auf vorzeitiges Ablösen des Zellrasens sollte trotz alledem geachtet werden. Ob durch Scherkräfte oder infektionsbiologische Prozesse bedingt, können Daten unter diesen Bedingungen nicht erfolgreich ausgewertet werden. Die Verwendung robuster Zelllinien wird als unabdingbare Voraussetzung in der Anwendung dieses Systems gesehen.

Kritisch sollte im Rahmen der Etablierung des *Cp. psittaci* - Infektionsmodells der Infektionsstatus der Kultur diskutiert werden. Infolge ausreichender Durchmischung der Chlamydien suspension sollte von einer Gleichverteilung des Infektionsstatus ausgegangen werden. Vor allem bei sehr geringen Infektionsdosen können nicht reproduzierbare Ergebnisse diskutiert werden. Ausschlaggebend für die Reproduzierbarkeit der Daten ist die Anzahl an infizierten Zellen im untersuchten Zellareal. Durch eine flächendeckende Datenerhebung (3 Messpunkte) und nachstehende Datenmittelung sollte abweichenden Ergebnissen infolge inhomogener chlamydialer Verteilungen entgegengewirkt werden.

Reflektierend wird dem *in vitro* - LigandTracer® - System ein hoher Stellenwert zur Charakterisierung von Echtzeitmodalitäten beigemessen. Grundlegende Interaktionsstudien bieten die Möglichkeit Tracer kostengünstig, zeitsparend und effizient zu charakterisieren. Vorgelagert können gewinnbringende Aufschlüsse zur *in vitro* - Interaktion neu generierter Tracer gewonnen werden und die Übertragung auf ein *in vivo* - System, wie beispielsweise PET / CT - Untersuchungen, abgewogen werden.

#### **5.4. Untersuchung des Glukosestoffwechsels infolge einer *Cp. psittaci* - Infektion *in vitro* unter Anwendung von [<sup>18</sup>F] - FDG am LigandTracer® - System**

In der Literatur werden chlamydiale Infektionsprozesse mit einem gesteigerten Glukoseverbrauch, einhergehend mit einer zunehmenden ATP - Syntheserate sowie vermehrter Glukosetransporter - Expression der infizierten Zelle in Verbindung gebracht (Moulder, 1970; Ojcius *et al.*, 1998; Harkinezhad *et al.*, 2009). Diese Beobachtungen korrelieren dabei zeitlich mit der maximalen RB - Proliferation (Bavoil *et al.*, 2000) und unterstreichen die Höchstleistung des Energiemetabolismus der infizierten Zelle aber auch des Pathogens zur Generierung einer neuen bakteriellen Population. Aufbauend auf der etablierten LigandTracer® - Technologie wurden im Rahmen eines *proof of principle* - Experiments die in der Literatur festgehaltenen, gesteigerten Glukoseverbrauchsrate der infizierten Zelle (MOI 0,0625; MOI 0,25; MOI 1; MOI 2) auf das Analogon [<sup>18</sup>F] - FDG übertragen. In der einschlägigen Literatur konnten keine Hinweise auf adäquate *in vitro* - Experimente gefunden werden.

Bei der geringsten Infektionsdosis (MOI) von 0,0625 koinzidiert die in der Literatur beschriebene gesteigerte Aufnahmeenergie reicher Metabolite mit einem Anstieg der [<sup>18</sup>F] - FDG - Aufnahme. Verglichen mit nicht - infizierten Kulturen konnte eine Zunahme der [<sup>18</sup>F] - FDG - Resorption um +36,34 % gemessen werden. Die *in vitro* - Anwendung von [<sup>18</sup>F] - FDG zur Darstellung des zellulären Energiebedarfs konnte für diesen Teil des *proof of principle* - Experiments

gezeigt werden. Mit einer gesteigerten Expression an Glukoserezeptoren (GLUT 1) einhergehend, erfolgt eine Akkumulation des Glukoseanalogons in der Wirtszelle (Ojcius *et al.*, 1998; Bavoil *et al.*, 2000). Entgegen der Erwartungen stellten sich [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulationen höherer Infektionstiter, verglichen mit nicht - infizierten Kulturen, dar. Steigende Infektionsdosen (MOI 0,25; MOI 1; MOI 2) gingen mit abnehmenden [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Aufnahmezeiten einher, sodass bei einer MOI von 2 (+ 4,57%) Werte vergleichbar der Kontrollen detektiert wurden. Arbeiten von Ojcius *et al.* (1998) können zur Klärung dieser Ergebnisse jedoch nicht beitragen, da der Glukosestoffwechsel lediglich bei einer gleichbleibenden Infektionsdosis betrachtet wurde. Vergleichende Untersuchungen des Glukosestoffwechsels abweichender Infektionstiter konnten in der einschlägigen Literatur nicht gefunden werden.

In diesem Zusammenhang bleibt die Kausalität der umgekehrt proportionalen Daten zu diskutieren. Grundlegend kann der Einfluss des 30 - minütigen Vorlaufs als beeinflussender, kritischer Faktor in Betracht gezogen werden. In diesem Zeitraum steht der Zelle lediglich glukosefreies Medium zur Verfügung. Selbst durch die anschließende Zugabe von [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG in glukosefreiem Medium kann dieser Mangelzustand nicht kompensiert werden. Wie eingangs beschrieben wird [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG zwar intrazellulär akkumuliert, eine Metabolisierung des Glukoseanalogons findet jedoch nicht statt. Folgend bleibt dieser Mangelzustand für die Zelle über den gesamten Versuchszeitraum bestehen. Glukosemangel stellt einen nicht zu vernachlässigenden Stressfaktor für die Zelle dar, dessen metabolische Einflüsse vielseitig sind. Der Glukosemetabolismus ist der Hauptweg zur Generierung von Energie und anderer Biomaterialien zur Erhaltung der Lebensprozesse (Zhao *et al.*, 2009). Umfassend werden ATP - abhängige Stoffwechselprozesse wie Proteinfaltungs- und Glykosylierungsreaktionen beeinträchtigt. Neben den genannten Argumenten bezüglich der Geräteparameter, sollte auch aus diesem Grund die Versuchsdauer bei beschriebener Messanordnung zeitlich nicht länger ausgedehnt werden. Über längere Messzeiträume kann diese Stressreaktion infolge des Mangelzustands ein Ablösen der Zellen vom Träger nach sich ziehen. Verlässliche Aussagen zur physiologischen Tracerakkumulation könnten nicht getroffen werden.

Zu erörtern bleibt zudem der Einfluss des Pathogens auf das Wirtssystem und dessen Glukosemetabolismus. Ansteigende Infektionstiter gehen mit reduzierten Aufnahmezeiten des Glukoseanalogons einher. Infektionsbedingte apoptotische Ereignisse können als ursächlich für die erhobenen Daten angesehen werden. Arbeiten von Ojcius *et al.* (1998) unterstreichen diese Vermutung. Bereits 24 h nach Infektion konnten gesteigerte Apoptoseraten sowie zytotoxische Effekte infolge einer *Cp. psittaci* - Infektion *in vitro* nachgewiesen werden. Bekräftigt wird dies durch Berichte, die den Zelltod mit vorausgehenden Veränderungen des Glukosemetabolismus infolge von Stressreaktionen in Verbindung bringen (Haberkorn *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2009). Chlamydiale Infektionen erhöhen zudem den mitochondrialen Metabolismus und induzieren oxidativen Stress, was zur Aktivierung des pro - apoptotischen Proteins BAX führt (Byrne *et al.*,

2004). All diese Zusammenhänge unterstreichen die Beobachtung, dass die detektierte Abnahme der [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation im untersuchten *in vitro* - System infektionsbiologisch begründet liegt.

In Summe bleibt festzuhalten, dass [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG zur *in vitro* - Untersuchung des Glukosestoffwechsels erfolgreich angewendet werden kann. Anreicherungen des Tracers infolge einer *Cp. psittaci* - Infektion können in Echtzeit mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit etablierten LigandTracer® - Systems vorgenommen werden. In Abhängigkeit vom Untersuchungsschwerpunkt muss der chlamydiale Infektionstiter abgewogen und gegebenenfalls adaptiert werden.

### 5.5 Untersuchung von *Cp. psittaci* - Infektionen am embryonierten Hühnerei mittels [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG

Page (1959) wies anhand von Infektionsversuchen an Puten nach, dass sich *Cp. psittaci* nach Inhalation innerhalb der ersten 24 Stunden sehr stark in Epithelzellen der Lunge und in den Luftsäcken vermehrt. Nach 48 Stunden hat eine Generalisierung über das Blut, vor allem von Lunge und Luftsäcken ausgehend, stattgefunden. Ab diesem Zeitpunkt können die Erreger in fast allen Organen – vor allem Milz und Leber - nachgewiesen werden (Page 1959; Beasley *et al.*, 1959, Kraus & Schmeer 1992; Nuechter 2004; Bönner 2005). Ziel war es, den in der Literatur beschriebenen aviären *in vivo* - Infektionsverlauf am Modellsystem Hühnerembryo zu reproduzieren und das bildgebende Verfahren PET / CT zur Diagnostik einzusetzen. Einleitend geschilderte Gründe prädestinieren das embryonierete Hühnerei als Modellsystem (Kapitel 1.2). Aufbauend auf der erfolgreichen Etablierung der Isofluran - Anästhesie (Kapitel 4.1), der Einführung einer intravaskulären Applikationsroute (Kapitel 4.2.1) sowie der Anwendbarkeit von [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG, wurde der *in vivo* beschriebene Infektionsprozess auf das *in ovo* - System übertragen und mittels [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - PET charakterisiert.

Verglichen mit den Kontrollen, konnten [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulationen in der Leber und Milz eindeutig festgestellt werden. Diese *hot spots* stellen Bereiche hoher Stoffwechselaktivität dar, die Analogien zu den *in vivo* erhobenen Daten von Page (1959) aufweisen. Inwieweit diese Akkumulation *per se* als infektionsbiologisch bedingt eingestuft werden kann, muss grundsätzlich weiter geprüft werden, insofern die bildgebende Methode PET / CT als alleiniges Verfahren zur Datenauswertung herangezogen wird.

Obwohl die [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - PET und [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG – PET / CT bei einer Vielzahl an Tumoren als Methode der Wahl beim *Staging* und bei der Evaluation des Therapieansprechens angesehen wird, hat sich die Technik bei der Abklärung entzündlicher und infektiöser Erkrankungen nicht im gleichen Maß durchgesetzt. Der Stellenwert bei einer Vielzahl von infektiösen und nicht - infektiös entzündlichen Erkrankungen wird in der Literatur diskutiert. Bisherige Erfahrungen von [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - PET verdeutlichen, dass eine strikte Differenzierung von inflammatorischen bzw. infektionsbiologischen Prozessen nicht möglich ist, da beide Vorgänge in einem *in vivo* - System nicht separat zu betrachten sind. Die Akkumulation von [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG basiert demnach auf der gesteigerten Glukoseaufnahme aktivierter Granulozyten und Makrophagen, infolge zellulärer Aktivitäten wie Chemotaxis, Phagozytose und dem mikrobiellen Abbau der Pathogene (Rennen *et al.*, 2001).

Zwingend müssen in der Datenauswertung von Infektionsprozessen auch inflammatorische Prozesse berücksichtigt werden.

In der Literatur konnte die erfolgreiche Anwendung von [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG zur Darstellung von Infektionsprozessen infolge bakterieller Inokulation gezeigt werden (Sugawara *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 2003; Love *et al.*, 2005). Deutliche Akkumulationen an den erwarteten Infektionsstellen belegen die vielversprechende Einsatzmöglichkeit von [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG als diagnostisches Agens. Übereinstimmend wird von den Autoren jedoch die Problematik der Differenzierung von Infektion und Inflammation diskutiert. Primär gelten Akkumulationen der Milz als schwierig zu bewerten, insofern sich diese mit dem zu erwartendem Infektionsschwerpunkt überschneiden. Die Milz als Teil des Immunsystems erfüllt viele Aufgaben, wie die Beseitigung eingekapselter Bakterien, die Produktion von Immunglobulinen sowie die Phagozytose infektiöser Agenzien. Auch Sugawara *et al.* (1999) bewerten diesen Aspekt als kritisch, insofern in eigenen Studien neben den eigentlichen Infektionsschwerpunkten höhere [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulationen in Leber und Milz detektiert wurden. In die Diskussion werden von den Autoren ebenfalls gesteigerte Phagozytoseraten und die Antikörperproduktion der Milz sowie der Leber als phagozytierendes Organ einbezogen.

Lediglich immunsupprimierte Untersuchungsobjekte bieten die Möglichkeit, Infektionsprozesse losgelöst von Entzündungsreaktionen zu betrachten (Love *et al.*, 2005).

*In vitro* - Untersuchungen von *Cp. psittaci* - infizierten Zellen mittels LigandTracer® - Technologie zeigten eine gesteigerte [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation. Anreicherungen infolge inflammatorischer Prozesse können *in vitro* ausgeschlossen werden. Aufbauend auf diesen Daten wird eine analoge, gesteigerte [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Aufnahme in infiziertem *in ovo* - Gewebe postuliert und als ursächlich für detektierte *hot spots* betrachtet. Welcher Anteil der Anreicherung inflammatorisch bzw. infektionsbiologisch bedingt ist, kann im Rahmen dieser Ergebnisse nicht eindeutig festgestellt werden. Selbst immunhistologische Untersuchungen inflammatorischer Zellen könnten zur Klärung dieses Sachverhaltes nicht beitragen.

In die Datenauswertung wurden histologische Befunde der akkumulierten Milzen und Lebern als Referenzmethode einbezogen. Eine positive Korrelation zwischen [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation und Erreger - Penetration konnte hergestellt werden. Anreicherungen des Tracers, die zu falsch positiven Ergebnissen führten, konnten in den Untersuchungen nicht festgestellt werden und unterstreichen die Eignung von [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG als diagnostisches Agens.

Ein problematischer Aspekt der szintigraphischen Methode ist die oft schwierige Zuordnung von pathologischen Aktivitätsbelegungen des Tracers zu bestimmten anatomischen Strukturen. Durch die hohe räumliche Auflösung des CT - Scanners sollte dieser Nachteil jedoch überwunden werden und eine Korrelation von physiologischen und anatomischen Daten ermöglichen. Die 3D - Visualisierung der anatomischen Strukturen im Embryo stellte sich im Rahmen der durchgeführten Arbeiten jedoch als schwierig dar. In diesem Zusammenhang, aber auch im Kontext gerätetechnischer Limitationen, können divergierende, individuell abweichende pathologische Anreicherungen erklärt

werden. Die Befunde der PET - Bilder sollten idealerweise vorerst in Unkenntnis der Diagnose erfolgen. Subjektive Einflüsse sollten somit unterbunden werden. Neben einer rein visuellen Beurteilung kann zudem eine quantitative Auswertung mit *regions of interest* (ROIs) vorgenommen werden. ROIs können händisch eingezeichnet werden oder es kann auf ein standardisiertes ROI - Schema zurückgegriffen werden. Die geringe Größe und mangelnde Kontrastierung der anatomischen embryonalen CT - Strukturen erschwerte die Einführung standardisierter Auswertungsalgorithmen. ROIs wurden deshalb manuell im PET - Bild für jeden Embryo separat eingezeichnet. Als schwierig stellt sich zudem die relativ geringe räumliche Auflösung des PET - Scanners von circa 1,4 mm dar. Gerade das manuelle Zeichnen von ROIs sehr kleiner weicher anatomischer Strukturen wie der Milz, kann als mögliche Ursache variierender Anreicherungen angesehen werden. Erschwernisse durch die limitierte Kontrastierung zwischen weichem Gewebe kann durch die Applikation von Kontrastmitteln im Rahmen der CT - Untersuchung entgegnet werden und der präziseren PET - Datenauswertung zuträglich sein. Pharmakologische Effekte könnten gerade bei hohen Dosen initiiert und müssten individuell abgeglichen werden (Hildebrand *et al.*, 2008).

Die Kleintierbildgebung im Allgemeinen setzt anästhetische Maßnahmen voraus, wobei das zur Narkose eingesetzte Agens idealerweise keinen Effekt auf die Physiologie des Untersuchungsobjektes und somit auf die Ergebnisse der Studie haben sollte (Hildebrandt *et al.*, 2008). Neben spezifischen Effekten induzieren Anästhetika im Allgemeinen hypothermische Zustände in kleinen Versuchstieren, was die Temperaturkontrolle und das Wärmen der Individuen während der Messungen unabdingbar macht (Fueger *et al.*, 2006). Es ist zwar bekannt, dass Hühnerembryonen über lange Zeit niedrigen Temperaturen stand halten (New, 1966), Einflüsse auf die physiologische Tracerverteilung können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Durch den Einsatz einer Wärmekammer kann diesem Problem in zukünftigen Experimenten entgegengewirkt werden.

In diversen Arbeiten wurde zudem der Einfluss verschiedener Anästhetika auf die [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG - Akkumulation *in vivo* diskutiert. So untersuchten Toyama und Kollegen (2004) an Mäusen den Einfluss der Isofluran - Anästhesie auf die [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG - Verteilung im Gehirn und Herz. Isofluran narkotisierte Mäuse zeigten signifikant geringere [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG - Aufnahmezeiten im Gehirn sowie höhere Akkumulationen im Herzen, verglichen mit nicht anästhesierten Individuen. Isofluran erhöht den Blutglukosespiegel nur minimal und zeigt keine signifikanten Effekte auf die [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG - Aufnahmezeit in Tumoren (Hildebrand *et al.*, 2008). Am embryonierten Hühnerembryo stehen diesbezügliche Untersuchungen jedoch aus und wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Im humanmedizinischen Bereich ist der Einfluss des Blutglukosespiegels auf die [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG - Verteilung gut untersucht und verstanden. Da Glukose mit dem Analogon [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG um den intrazellulären Transport und die Phosphorylierung konkurriert, sinkt die [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG - Aufnahme mit steigendem Blutglukosespiegel (Fueger *et al.*, 2006). Diätische Maßnahmen sowie postdiagnostische Untersuchungen des Blutglukosespiegels werden daher im humanmedizinischen Bereich, aber auch in

der Kleintierbildgebung routinemäßig durchgeführt. Durch Fasten wird die [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Aufnahme in Tumoren erhöht, was zu kontrastreicheren Bildern führt. Hühnerembryonen stellen hingegen ein autarkes System dar, dessen Nährstoffangebot *in ovo* limitiert ist. Beim Legen bestehen zu bebrütende Eier vor allem aus Lipiden des Dotters und Albumen sowie einem geringen Anteil an Kohlenhydraten (0,2-0,3 g/65 g Ei; Romanoff, 1967). Während der Embryonalentwicklung konnten Sunny und Kollegen (2010) Unterschiede im Blutglukosespiegel kleiner (51,1 g  $\pm$  3.46 g) und normal großer (65  $\pm$  4.35 g) Eier feststellen. Da Blutuntersuchungen vor einer PET / CT - Messung als zu aufwändig eingestuft und Einflüsse auf die Vitalität nicht ausgeschlossen werden können, wird in diesem Zusammenhang empfohlen, innerhalb einer Studie Eier analoger Größen zu verwenden. Abweichungen des Blutglukosespiegels und möglichen Einflüssen auf die Tracerakkumulation konnte somit entgegengewirkt werden. Reflektierend bleibt zu bemerken, dass der Umgang mit den Individuen einen entscheidenden Einfluss auf die [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Verteilung hat. Standardisierte Protokolle zum Umgang und zur Auswahl der im Versuch verwendeten Hühnerembryonen, zur Temperaturkomponente sowie zur Anästhesie waren entscheidend zur Generierung reproduzierbarer Daten.

*Cp. psittaci* wird hauptsächlich aerogen übertragen und löst auch nur auf diesem Weg eine manifeste Ornithose aus (Page, 1959). Dies geschieht über das Inhalieren erregerrhaltigen Staubes getrockneter Exkrememente oder des Aerosols chlamydienhaltiger Sekrete (Page 1959; Page & Grimes 1984; Storz & Kraus 1985). Da aerogene Infektionen am Hühnerembryo praktisch nicht durchzuführen sind, wurde der Infektionsweg über die CAM gewählt. Wie bereits einleitend geschildert, ist die CAM, analog der Lunge, stark vaskularisiert und so dem Lungengewebe in anatomischem Aufbau und Funktion vergleichbar. Die Infektion über die CAM ist eine standardisierte Methode, die routinemäßig bei Infektionsprozessen *in ovo* Anwendung findet. Aufbauend auf den Untersuchungen von Page (1959), wird die systemische Verteilung des Pathogens *Cp. psittaci* über das Blutssystem, ausgehend von der CAM als Infektionsstelle, postuliert.

Bei differenzierter, individueller Betrachtung der histologischen Ergebnisse der Milzen und Lebern zeigte sich, dass die Erregerpenetration der untersuchten Organe Differenzen aufweist. Bei vier der sechs untersuchten Embryonen konnten *post mortem* in der Leber und der Milz Erreger histologisch detektiert werden. Zwei der untersuchten Individuen zeigten jedoch in keinem der genannten Organe Anreicherungen des Pathogens. Trotz der Annahme eines positiven Infektionsgeschehens, der Verwendung gleicher Konservenchargen von *Cp. psittaci* sowie analoger Infektionsschemata wurden Abweichungen im Infektionsverlauf festgestellt. Neben der Infektionsmethode werden nachstehend in diesem Zusammenhang biologische Aspekte diskutiert. In diesem Kontext bleiben Überlegungen zum experimentellen Design der Infektion *per se* über die CAM zu beleuchten. Die punktuelle Öffnung der Eischale zur Applikation des Inokulums stellt einen minimal invasiven Eingriff dar, welcher mögliche Sekundärinfektionen weitestgehend unterbindet. Eine kontrollierte, exakte Positionierung wird experimentell durch die senkrechte Applikation auf die

CAM zwar begünstigt, Faktoren die innerhalb des Eies eine Rolle spielen können jedoch nicht ausgeschlossen werden. So ist unter anderem die Wirkung und Größe der artifiziellen Luftblase auf die Embryonalentwicklung sowie das Penetrationsgeschehen von Erregern nicht untersucht. Die Distanz des inokulierten Pathogens zu einem Blutgefäß der CAM kann ebenfalls als beeinflussender Faktor auf das Infektionsgeschehen angesehen werden. In wie weit das Inokulum nach Applikation direkt mit der CAM interagiert oder mögliche Wechselwirkung mit der Schalenhaut eingeht und dort verbleibt, können keine Aussagen getroffen werden. Durch reproduzierte methodische Infektionsabläufe soll genannten Kriterien jedoch weitestgehend entgegnet werden.

Infektionen entstehen, wenn Pathogene in einen Organismus eindringen, sich in ihm vermehren und eine Immunantwort auslösen. Im Falle latenter Infektionen hingegen bleibt diese körpereigene Antwort aus. Bei Hühnern verläuft die Infektion mit Chlamydien in der Regel latent (Böner, 2005). Hühnerembryonen betreffende, diesbezügliche Angaben konnten in der Literatur jedoch nicht gefunden werden. Ob es zu einer Vermehrung des Pathogens kommt und wie heftig die Infektion verläuft, hängt vom Verhältnis zwischen Erreger und Immunsystem ab. Im Rahmen biologischer Einflussfaktoren auf den Infektionsverlauf kann einerseits die Latenz des Erregers, andererseits auch die immunologische Diversität einzelner Individuen diskutiert werden. Die unterschiedliche Ausstattung mit Immunglobulinen (IgG) hängt dabei entscheidend vom Muttertier ab und wird vor dem Legen des Eies festgelegt. Maternales IgG wird während der Eibildung in erheblichen Mengen aktiv über das Follikelepithel in den Dotter sezerniert. Etwa ab dem 12. Tag der Embryonalentwicklung kommt es zur Resorption des Dotter – IgG's über die Dottersackgefäße in das Blut des Embryos. Dieser weist zum Schlupf IgG - Konzentrationen von 5 – 7 mg / ml auf, Werte die denen adulter Tiere nahezu entsprechen (Kaspers & Göbel 2000; Fellah *et al.*, 2008). Abweichungen im Immungeschehen können demnach durch die Menge und Individualität an maternalem IgG variieren. Infolge wiederholter antigener Stimulation werden aviäre, maternale IgG's gebildet, die das qualitativ und quantitativ wichtigste Immunglobulin im Serum darstellen. Da die befruchteten Hühnereier aus konventioneller Haltung bezogen wurden, können Erregerkontakte und dementsprechende Antikörpersynthesen nicht ausgeschlossen werden. Ohne Berücksichtigung des finanziellen Aspekts, empfiehlt sich die Anwendung spezifiziert pathogenfreier - Eier (SPF). Diese stammen aus infektiologisch kontrollierten Hühnerbeständen spezieller Haltungssysteme, die eine Abschirmung gegen die Kontamination aus der Umwelt gewährleisten (Seemann, 2005). Die Haltung der überwiegenden Mehrzahl von Versuchstieren erfolgt gemäß des SPF - Hygienekonzepts und bedingt die regelmäßige Untersuchung auf pathogene Mikroorganismen. Beeinträchtigungen von Experimenten, beispielsweise durch Immunreaktionen oder abweichender Organmorphologien werden somit vermieden.

Erregerpenetrationen unterschiedlicher Intensität *in ovo* können als Ursache für Abweichungen der [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation gesehen werden. Anreicherungen des Tracers infolge der Infektion konnten in Leber und Milz verglichen mit uninfierten Embryonen detektiert werden,



weshalb diese Organe in die histologische Untersuchung einbezogen wurden. Im Rahmen der PET - Auswertung wurde zudem die physiologische Akkumulation der Gelenke und des Gehirns als Referenzposition berücksichtigt, um Aussagen zur Reproduzierbarkeit der Daten zu erhalten.

Leber und Milz stellen laut Page (1959) den aviären Infektionsschwerpunkt bei einer Ornithose dar, was anhand deutlicher  $[^{18}\text{F}]$  – FDG - Aufnahmeraten bestätigt werden kann. Bei übergeordneter Betrachtung der Daten fällt zunächst auf, dass die Akkumulationen der Milzen deutlich über denen der Lebern liegen. Trotz höherer Infektionstiter der Lebern, was am Beispiel des Embryos 8 sehr gut verdeutlicht wird, wurden signifikant höhere  $[^{18}\text{F}]$  – FDG - Konzentrationen in der Milz detektiert. Als ursächlich können bereits diskutierte inflammatorische Prozesse der Milz, als zentraler Teil des Immunsystems, gesehen werden.

Ein deutlich positiver Zusammenhang zwischen der Erregerpenetration in der Leber und der  $[^{18}\text{F}]$  – FDG - Anreicherung zeigt sich für die Embryonen 8, 9 und 10. Nachweislich höhere Titer chlamydialer Kolonien im Gewebe induzieren steigende  $[^{18}\text{F}]$  – FDG - Akkumulationen. Einschränkend gilt diese Beobachtung für die Embryonen 7 und 12. Trotz fehlender Erregerpenetration in der Leber des Embryo 7 sind minimal positive  $[^{18}\text{F}]$  – FDG - Akkumulationen, verglichen mit dem Mittelwert uninfizierter Embryonen, zu verzeichnen. Umgekehrtes Bild zeigt sich bei der Auswertung des Embryos 12. Trotz positiven Nachweises chlamydialer Kolonien stellt sich die  $[^{18}\text{F}]$  – FDG - Anreicherung unterhalb der Werte der untersuchten Kontrollembryonen dar. Ursächlich für diese minimalen Abweichungen können die bereits diskutierten methodischen Limitationen sowie die Schwierigkeiten des manuellen Zeichnens der ROIs diskutiert werden. Um dieses Problem der diagnostischen Aussagekraft der  $[^{18}\text{F}]$  – FDG – PET - Untersuchung zu präzisieren und falsch positive bzw. negative Resultate zu vermeiden, wird das Einführen eines Schwellenwertes empfohlen. Im Rahmen des untersuchten Kollektivs *Cp. psittaci* - infizierter Embryonen, empfiehlt sich ein Schwellenwert für die Leber von +5 % der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (ID / g).  $[^{18}\text{F}]$  – FDG - Anreicherungen oberhalb dieser Schwelle deuten auf ein positives Infektionsgeschehen verglichen mit uninfizierten Embryonen hin. Der falsch positive Befund des Embryos 7 liegt dann unterhalb dieser Schwelle. Oberhalb dieses Schwellenwertes werden keine falsch positive Befunde gefunden. Unter Berücksichtigung der geringen Stichprobenzahl ist die Einführung einer solchen Schwelle sicher zu diskutieren und dient als erster Vorschlag als Ergebnis dieser initialen Experimentalreihe. Nach Bestätigung dieses Schwellenwertes an einem größeren Kollektiv *Cp. psittaci* - infizierter Embryonen, kann dieser Wert als Entscheidungshilfe im Rahmen einer vereinfachten Diagnostik angesehen werden. Die dadurch erbrachte Aufwertung der Anwendung der  $[^{18}\text{F}]$  – FDG - PET in der Darstellung und Diagnostik einer *Cp. psittaci* - Infektion an 16 Tage alten Hühnerembryonen ist die Voraussetzung für eine systematische Verwendung dieser Methode. Analoge infektionsbiologische Prozesse könnten dreidimensional abgebildet untersucht werden.

Analog der untersuchten Lebern wurden die Milzen der Embryonen ausgewertet. Auch hier korreliert das positive Infektionsgeschehen deutlich mit der  $[^{18}\text{F}]$  – FDG - Akkumulation, sodass

maximale [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Anreicherungswerte von +47,22 % (Embryo 9) oberhalb der uninfizierten Embryonen detektiert wurden. Gegenläufig zeigt sich das Verhältnis aus Infektionsrate und Tracer-Akkumulation. Entgegen der Erwartung, korreliert die Anzahl an detektierten chlamydialen Kolonien nicht mit der Anreicherung des Glukoseanalogons. Diesbezüglich kritisch zu bewerten bleibt die Methode der histologischen Koloniebestimmung, die Limitation des Gerätes bei einer sehr kleinen zu untersuchenden Struktur wie der Milz sowie die Problematik des manuellen Zeichnens der ROIs. Auch die bereits diskutierten möglichen individuellen immunologischen Ausstattungen der Embryonen können als Ursache für abweichende Anreicherungswerte der Milz angesehen werden. In Summe bleibt jedoch festzuhalten, dass ein positives Infektionsgeschehen infolge gesteigerter Akkumulationsraten mittels [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - PET festgestellt werden konnte. Jedoch wird auch für die Milzen das Einführen eines Schwellenwertes von +10 % ID / g empfohlen. Oberhalb dieser Schwelle befinden sich alle richtig positiv diagnostizierten Embryonen. Lediglich der Wert des Embryos 7 zeigt trotz negativer Erregerpenetration, analog der Leber, eine positive Tracer - Akkumulation und befindet sich deshalb als falsch positiv bewertet unterhalb der festgesetzten Schwelle. Reflektierend werden die erhobenen Daten der Milzen sowie das Einführen eines Schwellenwertes als Aufwertung der [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - PET betrachtet. Ein Zugewinn in der Darstellung und Diagnostik einer *Cp. psittaci* - Infektion an 16 Tage alten Hühnerembryonen kann verzeichnet werden und stellt die Grundlage für analoge infektionsbiologische Untersuchungen dar.

Die erhobenen PET-Daten des Embryos 11 sind sowohl für die Milz als auch für die Leber schwer zu interpretieren. Deutliche Anreicherungen unterhalb der erhobenen physiologischen Akkumulationswerte der Kontrollen können im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen nicht ausgewertet werden. Ob individuelle Inkorrektheiten oder embryonale Differenzen zu diesem Resultat führten, bleibt offen.

Zudem bleibt bei Betrachtung der Daten zu bemerken, dass deutliche Akkumulationen in genannten Organen mit einer Umverteilung an [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG aus dem untersuchten Gelenkbereich einhergehen. Der gesteigerte Stoffwechsel der infizierten Lebern und Milzen, bedingt einen deutlichen Mehrbedarf am Glukoseanalogon [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG.

**Tab. 21: Vergleichende Darstellung der [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG – Akkumulation mit der Anzahl koloniebildender Einheiten in Leber und Milz von *Cp. psittaci* – infizierten Hühnerembryonen**

	Leber		Milz	
	CFU / mm <sup>2</sup>	[ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation % ID / g (prozentuale Anreicherung vgl. Kontrolle)	CFU/mm <sup>2</sup>	[ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation % ID / g (prozentuale Anreicherung vgl. Kontrolle)
Embryo 7	0	+2,4	0	+5,1
Embryo 8	12,83	+27,65	5,59	+35,96
Embryo 9	4,74	+9,39	3,04	+47,22
Embryo 10	1,89	+1,36	1,73	+31,43
Embryo 11	0	-14,87	0,01	-15,19
Embryo 12	1,41	-2,24	0,74	+17,66

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass der Grad der [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG-Anreicherungen der untersuchten *hot spots* in Leber und Milz mit der Anzahl an histologisch detektierten *Cp. psittaci* Kolonien weitestgehend korreliert (Tab.: 21). Ein direkter Zusammenhang zwischen Akkumulation und Infektionsgrad kann hergestellt werden. Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit der Daten der Kontrollembryonen kann vom optimalen Handling im Umgang mit den Embryonen ausgehend von der Bebrütung, der Infektion bis hin zur [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Applikation ausgegangen werden. Benannte Problemstellungen der Datenauswertung müssen jedoch zwingend in die Betrachtung der Ergebnisse einbezogen und entsprechend bewertet werden. In Summe kann der Nachweis einer bakteriellen *Cp. psittaci* - Infektion mittels [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG als gewinnbringender Ansatz zur dreidimensionalen Darstellung von intraembryonalen Infektionsherden betrachtet werden. Wiederholende Messungen ein und desselben Untersuchungsobjektes könnten zur Darstellung des Infektionsgeschehens beitragen und als echte Alternative zu molekularbiologischen bzw. rein histologischen Untersuchungen angesehen werden. Neben der Reduktion der Anzahl an einzusetzenden Individuen, könnten mögliche, individuell divergierende Infektionsabläufe charakterisiert werden.

## 5.6 Untersuchung von *Cp. psittaci* - Infektionen am embryonierten Hühnerei mittels $^{89}\text{Zr}$ - Antikörper

Wenngleich [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - PET-Untersuchungen vielversprechende Daten akquirieren, stellt die Anwendung des kurzlebigen Tracers [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG eine Limitation dar. Aussagen zum Infektionsverlauf über einen größeren Messzeitraum können nicht getroffen werden. Lediglich wiederholende Applikationen können diesem Problem entgegen, werfen aber zugleich die Frage nach der Einflussnahme auf das *in vivo* - System Hühnerembryo auf.

Neben repetitiven Tracerapplikationen sollte dem Anspruch langfristiger Messungen durch die Anwendung eines entsprechenden Tracers gerecht werden. Radionuklide mit einer Halbwertszeit von mehreren Tagen sind prädestiniert für Fragestellungen die einen längeren Versuchszeitraum erfordern

und erlauben Einblicke in die Verteilung und den Verbleib eines entsprechend radioaktiv markierten Moleküls. Im Rahmen dieser methodischen Variante sollte zudem eine direkte Markierung des *in ovo* zu charakterisierenden Pathogens *Cp. psittaci* realisiert werden. Diesbezüglich wurde die radioaktive Markierung eines anti – Chlamydia – LPS - Antikörpers mit  $^{89}\text{Zr}$ , mit dem Ziel Chlamydien direkt *in ovo* nachzuweisen, vorgenommen.

Das radioaktive Metall  $^{89}\text{Zr}$  hat eine Halbwertszeit von 78,4 Stunden und erfüllt somit die zeitlichen Anforderungen des Experiments. Zudem konnten in Tierstudien bereits Einblicke in die physiologische Verteilung des Nuklids gewonnen werden. In der Literatur wurden jedoch keine Hinweise auf die aviäre oder gar *in ovo* Anwendung dieses Radionuklids gefunden. Eine schnelle Assoziation von freiem  $^{89}\text{Zr}$  mit Serumproteinen sowie eine finale Einlagerung im Knochen charakterisiert die physiologische Verteilung des nicht komplexierten  $^{89}\text{Zr}^{4+}$  (Meijs *et al.*, 1997). Analogien wurden in experimentellen Untersuchungen auch am Hühnerembryo festgestellt. Im Rahmen der physiologischen Verteilungsstudie von freiem  $^{89}\text{Zr}^{4+}$  an 16 Tage alten Embryonen konnten Akkumulationen primär im Abdomen gemessen werden, was für die in der Literatur genannte Bindung an Serumproteinen spricht. Die Leber als zentral liegendes abdominales Organ transportiert große Mengen an Blut und stellt sich intraembryonal im PET - Bild dar. Auch die beschriebene finale Akkumulation in den Knochen kann im Embryo manifestiert werden. Bereits 20 Stunden nach der Applikation sind die Wirbelsäule, die Extremitäten sowie die Schädelknochen sichtbar. Intraembryonale Anreicherungen des Abdomens stellen sich nicht mehr dar, was für eine Umverteilung des Radionuklids in die Knochen spricht.

Lokalisationsstudien bedingen eine chemisch feste Bindung zwischen dem anzuwendenden Molekül und dem Radionuklid. Im Rahmen der Untersuchung zur Biostabilität sowie zur Charakterisierung der physiologischen Verteilung des  $^{89}\text{Zr}$  - markierten Antikörpers wurde der Tracer ebenfalls 16 Tage alten Hühnerembryonen intravaskulär appliziert. Aus den gewonnenen PET - Bildern lässt sich einerseits eine hohe Stabilität des Tracers ableiten. Da selbst nach 20 Stunden keine Anreicherungen in den Knochenstrukturen zu erkennen waren, kann von einer festen Bindung von Radionuklid und Antikörper ausgegangen werden. Andererseits kann mittels Bildgebung eine abweichende Verteilung im Abdomen verglichen mit reinem  $^{89}\text{Zr}$  verzeichnet werden. Neben der Leber konnte die Gallenblase als *hot spot* bereits eine Stunde nach Applikation ausgemacht werden. Eine weitere Umverteilung in andere anatomische Strukturen wurde auch 20 Stunden nach Applikation nicht festgestellt. Lediglich die Anreicherung in der Gallenblase nahm weiter zu.

Im Kontext der physiologischen Verteilung des markierten Antikörpers sind die biologischen Prozesse zu beleuchten, die das beschriebene Akkumulationsmuster ausmachen. Es wird angenommen, dass metabolische Prozesse der Leber die Akkumulation des markierten Antikörpers bedingen und zur Anreicherung in der Gallenblase beitragen. In der Literatur konnten keine Angaben analoger Studien am Hühnerembryo gefunden werden. Die Verteilung externer, intravaskulär

zugeführter Proteine muss im Kontext eines sich natürlicherweise autark entwickelnden Embryos *in ovo* beleuchtet werden.

Die zur Entwicklung von Hühnerembryonen essentiellen Nährstoffe werden vor dem Legen des Eies vom Muttertier zur Verfügung gestellt. Der maternale Nährstofftransfer auf den Embryo ist nachträglich nicht möglich und unterstreicht das unabhängige Wachsen und Entwickeln des Embryos. Innerhalb des Eies ernährt sich der Embryo primär von Fetten des Eidotters und Spuren an Kohlenhydraten (Foye *et al.*, 2006). Erst nach dem Schlupf erfolgt ein Umschalten von einer Fett-basierten auf eine Kohlenhydrat - basierte Energieversorgung. Die zusätzliche Applikation im Sinne des Fütterns der Embryonen wird zwar in der Literatur beschrieben, stellt aber einen Vorgang abweichend von der natürlichen Entwicklung dar. So beschreiben Uni *et al.* (2005) einen positiven Zusammenhang zwischen einer *in ovo* - Applikation von Kohlenhydraten und dem Gewicht zum Zeitpunkt des Schlupfes. Die etablierte Methode von Uni und Ferket sieht dabei eine Applikation der zu untersuchenden Substanz über die Amnionflüssigkeit vor, welche vom Embryo aufgenommen und metabolisiert wird. Diese enterale Route der Substanzapplikation unterscheidet sich vom gewählten intravaskulären Applikationsweg. Über die Verteilung externer intravaskulär zugeführter Proteine in ein autarkes System konnten in der Literatur keine Angaben gefunden werden. Postuliert wird der intraembryonale Transport des Tracers über den Chorioallantoiskreislauf, analog den Nabelgefäßen des Säugers (Van Golde *et al.*, 1996). Bei jeder Aufnahme von Proteinen übernimmt nachfolgend die Leber die Funktion eines primären Zwischenspeichers, der die unmittelbare Verwertung bzw. den Abbau nach sich zieht. Adulte Tiere scheiden überschüssige Proteine bzw. deren Abbauprodukte nach dem Transport in die Gallenblase über den Darm aus. Unterschiede der embryonalen Darmtätigkeit *in ovo*, verglichen mit der Ausscheidung adulter Tiere, werden als ursächlich für die Akkumulation des Tracers in der Gallenblase gesehen.

Effekte der *in ovo* - Applikation sind nicht immer vorhersagbar und nur unzureichend verstanden. Die Wahl der zu applizierenden Substanz sollte daher dem natürlichen Nährstoffbedarf des Embryos im Idealfall weitestgehend entsprechen, um die natürliche interne Entwicklung sowie Metabolisierung zu begünstigen. Da die Entwicklung des Embryos erst kurz vor dem Schlupf abgeschlossen und das Organsystem aktiv ist, können entwicklungsphysiologische Einflüsse jedoch nicht ausgeschlossen werden. So berichtet Foye (2005) infolge der *in ovo* - Applikation von Proteinen und Aminosäuren von einer Stimulation der Glukoneogeneseenzyme. Gesteigerte Mortalitäten (nur jeder dritte Embryo überlebte bis 20 Stunden nach Applikation) können möglicherweise somit begründet werden. Weiterführende Untersuchungen zur intravaskulären Proteinapplikation stehen aus und sind essentielle Grundlage für die Auswertung nachstehender Daten zur  $^{89}\text{Zr}$  - Antikörper Applikation.

Bei übergeordneter Betrachtung der Daten der nicht - infizierten als auch infizierten Embryonen fällt zunächst auf, dass gesteigerte Tracermengen im Ei mit gesteigerten % ID / g - Werten in der Leber und Gallenblase einhergehen, was für oben postulierten Metabolisierungsweg spricht.

Unter Berücksichtigung der divergierenden Tracerkonzentrationen im Ei fallen jedoch nur marginale Unterschiede zwischen uninfizierten und *Cp. psittaci* - infizierten Embryonen auf. Die angenommene gesteigerte Akkumulation des Tracers in der Leber und der Milz (analog [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG) konnte im Rahmen der durchgeführten Experimente nicht bestätigt werden. Selbst nach 20 - stündiger Inkubation konnten keine erhöhten Anreicherung des  $^{89}\text{Zr}$  - markierten Antikörpers in der Leber der infizierten Untersuchungsobjekte detektiert werden. Zudem wurden auch in der Milz, entgegen der in der Literatur beschriebenen Erregerpenetration, keine Akkumulationen des Tracers festgestellt. Dieses Organ ist nicht in metabolische Abbauprozesse involviert und unterstreicht zudem die Annahme, dass die beobachteten Tracerakkumulationen der Leber eine Folge des Proteinabbaus darstellen und nicht infektionsbiologisch bedingt sind.

Nach 20 - stündiger Inkubation des markierten Antikörpers wurde in der Leber eine Abnahme der Tracerkonzentration festgestellt, was für die genannte Umverteilung in die Gallenblase spricht. Verdeutlicht wird dies durch gesteigerte % ID / g - Werte dieser anatomischen Struktur. Akkumulationen infolge der Interaktion zwischen Pathogen und Tracer konnten im Rahmen der durchgeführten Experimente nicht festgestellt werden.

In diesem Zusammenhang müssen die bereits benannten Schwierigkeiten des manuellen Einzeichnens der ROIs sowie die nicht klar abgegrenzte anatomische Struktur der Leber und Gallenblase einbezogen werden (siehe [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG). Kritisch ist zudem die Überlagerung des Infektionsschwerpunktes mit dem Ort der Tracer - Metabolisierung zu sehen. *Hot spots* können nicht eindeutig detektiert werden und bedingen die Anwendung einer additiven Nachweismethode.

Andererseits muss der biologische Hintergrund dieses *proof of principle* - Experiments besprochen werden. Mit dem Ziel *Cp. psittaci* direkt nachzuweisen, wurde der anti - Chlamydia - LPS - Antikörper radioaktiv markiert und intravaskulär appliziert. Der obligat intrazelluläre Parasit kann direkt jedoch nur nachgewiesen werden, wenn die infizierte Zelle lysiert wurde und Elementarkörperchen austreten. Die Interaktion zwischen Tracer und Pathogen muss zu diesem Zeitpunkt erfolgen und bedingt das Vorliegen des Tracers im interzellulären Raum. Unter der Annahme, dass Interaktionen stattfinden, stellt sich auch die Frage nach dem Infektionsverhalten dieser chlamydialen Elementarkörperchen. In der Literatur beschriebene Neutralisationen des Pathogens infolge einer Antikörperbindung deuten auf fehlende nachstehende Infektionen benachbarter Zellen hin.

Reflektierend bleibt festzuhalten, dass dieser experimentelle Ansatz noch zu viele unbekannte Parameter enthält, die im Rahmen des *proof of concept* - Versuchs nicht geklärt werden konnten. Umfangreiche Studien zur Antikörperverteilung *in ovo*, zur Untersuchung entwicklungsphysiologischer Einflüsse infolge metabolisch abweichender Prozesse sowie zum Penetrationsverhalten markierter chlamydialer Elementarkörperchen *in ovo* stehen noch aus. Zudem sind in den gesteigerten Mortalitätsraten, vermutlich infolge der Tracerapplikation, deutliche Nachteile

zu sehen. Der eigentliche Vorteil dieser Methode, Untersuchungen zur Pathogenese von *Cp. psittaci* über ein größeres Zeitintervall durchzuführen, konnte noch nicht ausgenutzt werden.

## 6. Ausblick

Neben den in der Diskussion vorgeschlagenen weiterführenden Arbeiten weist die Thematik dieser Dissertation weiteres grundsätzliches Potential auf.

Die Etablierung des Hühnerembryonenmodells an das PET / CT beinhaltet unter anderem die Anästhesie der Embryonen *in ovo* zur artefaktfreien Darstellung unter Anwendung des Narkosegases Isofluran. Da es sich bei Hühnereiern im Zusammenhang mit PET / CT um ein noch junges Arbeitsfeld handelt, stehen aktuell keine Geräte zur Verfügung, die eine Standardisierung und übergreifende Anwendung realisieren. Diesbezüglich wäre es von Vorteil, beispielsweise die selbst hergestellte Narkosevorrichtung durch eine Narkosekammer zu ersetzen, welche angepasst an die Bettposition, den räumlichen Einschränkungen innerhalb des PET / CT - Scanners gerecht wird. Zunächst im Rahmen von PET / CT - Untersuchungen eingeführt, könnte diese Methode zukünftig auch bei anderen bildgebenden Verfahren, wie MRT, angewendet werden. Diesbezüglich in der Literatur beschriebene *ex vivo* / *ex ovo* – Darstellung bzw. das Immobilisieren der Embryonen durch das Arbeiten bei geringen Temperaturen kann mit Hilfe der Anästhesie umgangen werden. Zudem könnten *in vivo* betrachtete Embryonen wiederholenden Messungen unterzogen werden und so zur Reduktion der Anzahl an Untersuchungsobjekten beitragen.

Im Rahmen der Darstellung der Wirts - Pathogen - Interaktionen mittels [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG wäre es interessant, wie sich die Anreicherungen des Tracers zu diversen Zeitpunkten *post infectionem* darstellen. Durch die Möglichkeit wiederholender Messungen von Embryonen könnte aufgezeigt werden, ob sich Infektionsschwerpunkte temporal verändern bzw. differenzierte Akkumulationsmuster ergeben. Interessant wäre es zudem, analoge Versuche mit größeren, möglichst ebenso kommerziell verfügbaren Eiern durchzuführen. Beispielsweise sind auch Gänse und Enten ein Reservoir von *Cp. psittaci*. Möglicherweise kann so die Auswertung kleiner anatomischer embryonaler Strukturen verbessert werden. Ein Zugewinn ist weiterhin in der Etablierung einer geeigneten computergestützten, automatisierten Auswertungssoftware zu sehen.

Zudem kann das etablierte Modellsystem zur Untersuchung der Biostabilität von Tracern Anwendung finden. Initiale Untersuchungen könnten Tierversuchen an Maus oder Ratte vorgelagert werden und entscheidend zur Reduktion von Versuchstieren beitragen.



**Literaturverzeichnis**

- AbdelRahman Y. M., Belland R. J.** (2005) The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 949 - 959
- Aide N., Benayoun M., Kerrou K., Khalil A., Cadranel J., Talbot J. N.** (2007) Impact of [18F]-fluorodeoxyglucose ([18F]-FDG) imaging in sarcoidosis: unsuspected neurosarcoidosis discovered by [18F]-FDG PET and early metabolic response to corticosteroid therapy. *The British Journal of Radiology* 80: 67 - 71
- Akins R. E. & Tuan R. S.** (1993) Transepithelial calcium transport in the chick chorioallantoic membrane. *Journal of Cell Science* 105: 381 - 388
- Altura B. M. & Weinberg J.** (1979) Urethane and contraction of vascular smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 67: 255 - 263
- Ametamey S. M., Honer M., Schubiger P. A.** (2008) Molecular imaging with PET. *Chemical Reviews* 108: 1501 - 1516
- Antoch G., Vogt F. M., Freudenberg L. S., Nazahadeh F., Coehde S. C., Barkhausen J., Dahmen G., Bockisch A., Debatin J. F., Ruehm S. G.** (2010) Whole-body dual-modality PET/CT and whole-body MRI for tumor staging in oncology. *The Journal of the American Medical Association* 290 (24): 3199 - 3206
- Arras M.** (2007) Stellungnahme des Ausschusses für „Anästhesie und Analgesie“ der GV-SOLAS zum Einsatz von Tribromethanol bei Labortieren. Gesellschaft für Versuchstierkunde S. 1 - 7
- Arras M., Becker K., Eberspächer E., Haberstroh J., Henke J., Sager M.** (2010) Empfehlung Schmerztherapie bei Versuchstieren. Gesellschaft für Versuchstierkunde; Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz S. 1 - 74
- Asbury C.** (2011) Brain imaging technologies and their applications in neuroscience. *The Dana Foundation*
- Barron A. L., Olshevsky C., Cohen M. M.** (1970) Characteristics of the BGM line of cells from african green monkey kidney. *Archives of Virology* 32 (4): 389 - 392
- Bavoil P. M., Hsia R., Ojcius D. M.** (2000) Closing in on *Chlamydia* and its intracellular bag of tricks. *Microbiology* 146: 2723 - 2731
- Beasley J.N., Davis D.E., Grumbles L.C.** (1959). Preliminary studies on the istopathology of experimental ornithosis in turkeys. *American Journal of Veterinary Research* 20: 341 - 349.
- Beckers C., Ribbens C., Andre B., Marcelis S., Kaye O., Mathy L., Kaiser M.-J., Hustinx R., Foidart J., Malaise M. G.** (2004) Assessment of Disease Activity in Rheumatoid Arthritis with <sup>18</sup>F-FDG PET. *Journal of Nuclear Medicine* 45 (6): 956 - 964
- Beeres S., Bengel F. M., Bartunek J., Atsma D. E., Hill J. M., Vanderheyden M., Penicka M., Schalij M. J., Wijns W., Bax J. J.** (2007) Role of imaging in cardiac stem cell therapy. *Journal of the American College of Cardiology* 49: 1137 - 1148
- Bellairs R. & Osmond M.** (2005) The atlas of chick development. *Elsevier Academic Press*

- Berti V., Pupi A., Mosconi L.** (2011) PET/CT in diagnosis of dementia. *Annals of the New York Academy of Science* 1228: 81 - 92
- Beyer T., Townsend D. W., Brun T., Kinahan P. E., Charron M., Roddy R., Jerin J., Young J., Byars L., Nutt R.** (2000) A combined PET/CT scanner for clinical oncology. *Journal of Nuclear Medicine* 41: 1369 - 1379
- Bianco A., Mazzearella G., Rocco D., Gasperi M., Di Marco R., Brunese L.** (2010) FDG/PET uptake in asymptomatic multilobar *Chlamydia pneumoniae* pneumonia. *Medical Science Monitor* 16 (6): 67 - 70
- Bjorke H., Andersson K.** (2006) Automated, high-resolution cellular retention and uptake studies *in vitro*. *Applied Radiation and Isotopes* 64: 901 - 905
- Blockmans D., Knockaert D., Maes A., De Caestecker J., Stroobants S., Bobbaers H., Mortelmans L.** (2001) Clinical value of [<sup>18</sup>F]fluoro-deoxyglucose positron emission tomography for patients with fever of unknown origin. *Clinical Infectious Diseases* 32: 191 - 196
- Bockisch A., Kühl H., Freudenberg L., Antoch G., Müller S., Forsting M.** (2006) PET/CT-Evolution oder Revolution in der onkologischen Diagnostik? *Deutsches Ärzteblatt* 103 (5): 249 - 254
- Bönner B. M.** (2005) Die Chlamydiose des Geflügels. *LOHMANN Information* 3: 1 - 6
- Boone M. A.** (1963) A method of growing chick embryos *in vitro*. *Poultry Science* 42: 916 - 921
- Brake J., Walsh T. J., Benton C. E., Petitte J. N., Meijerhof R., Penalva G.** (1997) Egg handling and storage. *Poultry Science* 76: 144 - 151
- Braukmann M., Sachse K., Jacobsen I. D., Westermann M., Menge C., Saluz H.-P., Berndt A.** (2012) Distinct intensity of host-pathogen interactions in *Chlamydia psittaci*- and *Chlamydia abortus*-infected chicken embryos. *Infection and Immunity* doi: 10.1128/IAI.00437-12 IAI.00437-12
- Braun P. R., Al-Younes H., Gussmann J., Klein J., Schneider E., Meyer T. F.** (2008) Competitive Inhibition of amino acid uptake suppresses chlamydial growth: involvement of the chlamydial amino acid transporter BrnQ. *Journal of Bacteriology* 190 (5): 1822 - 1830
- Buchholz K.R., Stephens R.S.** (2007) The extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway induces the inflammatory factor interleukin-8 following *Chlamydia trachomatis* infection. *Infection and Immunity* 75: 5924 - 5929
- Burley R. W., D. V. Vadehra,** (1989) The Avian Egg: Chemistry and Biology. John Wiley and Sons, New York, NY.pp. 68 - 71
- Byfield M.P., Murray J.T., Backer J.M.** (2005) hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 33076 - 33082
- Byrne G. I. & Ojcius D. M.** (2004) *Chlamydia* and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nature Reviews* 2: 802 - 808
- Campbell M., Allen W.E., Sawyer C., Vanhaesebroeck B., Trimble E.R.** (2004) Glucose-potentiated chemotaxis in human vascular smooth muscle is dependent on cross-talk between the PI3K and MAPK signaling pathways. *Circulation Research* 95: 380 - 388

- Carabeo R. A., Grieshaber S. S., Hasenkrug A., Dooley C., Hackstadt T.** (2004) Requirement for the Rac GTPase in *Chlamydia trachomatis* invasion of non-phagocytic cells. *Traffic* 5: 418 - 425
- Cocchiario J. L., Kumar Y., Fischer E. R., Hackstadt T., Valdivia R. H.** (2008) Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the *Chlamydia trachomatis* parasitophorous vacuole. *PNAS* 105 (27): 9379 - 9384
- Cocchiario J. L., Valdivia R. H.** (2009) New insights into Chlamydia intracellular survival mechanisms. *Cellular Microbiology* 11 (11): 1571 - 1578
- Cohade C., Osman M., Leal J., Wahl R. L.** (2003) Direct comparison of <sup>18</sup>F-FDG PET and PET / CT in patients with colorectal carcinoma. *Journal of Nuclear Medicine* 44 (11): 1797 - 1803
- Crooks R. J. & Simkiss K.** (1974) Respiratory acidosis and eggshell resorption by the chick embryo. *The Journal of Experimental Biology* 61: 197 - 202
- Dekker M.** (1988) Alternatives to animal use in research, testing and education: *Produced by Office of Technology Assessment*, Congress of the US. pp 456., New York. Chapter 6, p 183 - 184
- Delevoye C., Nilges M., Dehoux P., Paumet F., Perrinet S., Dautry-Varsat A., Subtil A.** (2008) SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium. *PLoS Pathogens* 4: e1000022
- Deeming D. C. & Ferguson M. W.** (1991) Egg Incubation – Its effects on embryonic development in birds and reptiles. *Cambridge University Press* (Cambridge and New York)
- Deryugina E. I. & Quigley J. P.** (2008) Chick Embryo chorioallantoic membrane models to quantify angiogenesis induced by inflammatory and tumor cells or purified effector molecules. *Methods in Enzymology* 444: 21-41
- Dohle D. S., Pasa S. D., Gustmann S., Laub M., Wissler J. H., Jennissen H. P., Dünker N.** (2009) Chick ex ovo culture and ex ovo CAM assay: How it really works. *Journal of Visualized Experiments* 2009 (33): 1620
- Dong F., Sharma J., Xiao Y., Zhong Y., Zhong G.** (2004) Intramolecular dimerization is required for the Chlamydia-secreted protease CPAF to degrade host transcriptional factors. *Infection and Immunity* 72 (7): 3869 - 3875
- Dunn, B. E.** (1974) Technique for shell-less culture of the 72-hour avian embryo. *Poultry Science* 53: 409 - 412
- Durupt F., Koppers-Lalic D., Balme B., Budel L., Terrier O., Lina B., Thomas L., Hoeben R. C., Rosa-Calatrava M.** (2012) The chicken choioallantoic membrane tumor assay as model for qualitative testing of oncolytic adenoviruses. *Cancer Gene Therapy* 19 (1): 58 - 68
- El-Ghali N., Rabadi M., Ezin M., Bellard M. E.** (2010) New methods for chicken embryo manipulations. *Microscopy Research and Technique* 73 (1): 58 - 66
- Erhardt W., Henke J., Kroker R.** (2004) Allgemeinanästhetika. In: Erhardt, W., J. Henke, J. Haberstroh, eds.: Anästhesie und Analgesie bei Klein- und Heimtier sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen. Stuttgart: Schattauer, 369 - 405.

- Everett K. D. E., Bush R. M., Andersen A. A.** (1999) Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49: 415 - 440
- Fellah J. S., Jaffredo T., Dunon D.** (2008) Development of the avian immune system. pp: 51-66; In: *Avian Immunology* (Davison T. F., Kaspers B., Schat K. A.); Academic press Elsevier (London)
- Feller U., Dougherty R. M., Stefano H. S.** (1969) Morphogenesis of newcastle disease virus in chorioallantoic membrane. *Journal of Virology* 4 (5): 753 - 762
- Feeney R. E. & Nagy D. A.** (1952) The antibacterial activity of the egg white protein conalbumin. *Journal of Bacteriology* 64(5): 629 - 643
- Field K. J. & Lang C. M.** (1988) Hazards of urethane (ethyl carbamate): a review of the literature. *Laboratory Animals* 22: 255 - 262
- Finlay B. B. & Cossart P.** (1997) Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science*. 276 (5313): 718 - 725
- Foye O. T.** (2005) The biochemical and molecular effects of amniotic nutrient administration, "in ovo feeding" on intestinal development and function and carbohydrate metabolism in turkey embryos and poults. Ph.D. Dissertation. North Carolina State University. Raleigh, NC.
- Foye O. T., Uni Z., Ferket P. R.** (2006) Effect of in ovo feeding egg white Protein,  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. *Poultry Science* 85: 1185 - 1192
- Freeman B. M. & Vince M. A.** (1974) Development of the avian embryo: a behavioural and physiological study. *Chapman and Hall* (London and New York)
- Fuchs A. & Lindenbaum E. S.** (1988) The Two- and Three-Dimensional Structure of the Microcirculation of the Chick Chorioallantoic Membrane. *Acta Anatomica* 131: 271 - 275
- Fueger B. J., Czemin J., Hildebrandt I., Tran C., Halpem B. S., Stout D., Phelps M. E., Weber W. A.** (2006) Impact of animal handling on the results of  $^{18}\text{F}$ -FDG PET studies in mice. *Journal of Nuclear Medicine* 47: 999 - 1006
- Fulton F. & Isaacs A.** (1952) Influenza virus multiplication in the chick chorioallantoic membrane. *Journal of general Microbiology* 9: 119 - 131
- Ghosh S., Sharma A., Talukder G.** (1992) Zirconium: an abnormal trace element in biology. *Biological Trace Element Research* 35 (3): 247 - 271
- Glaudemans A. & Signore A.** (2010) FDG-PET/CT in infections: the imaging method of choice? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 37: 1986 - 1991
- Goellner S., Schubert E., Liebler-Tenorio E., Hotzel H., Saluz H. P., Sachse K.** (2006) Transcriptional response patterns of *Chlamydophila psittaci* in different *in vitro* models of persistent infection. *Infection and Immunity* 74: 4801 - 4808
- Gow N. A. R., Knox Y., Munro C. A., Thompson W. D.** (2003) Infection of chick chorioallantoic membrane (CAM) as a model for invasive hyphal growth and pathogenesis of *Candida albicans*. *Medical Mycology* 41 (4): 331 - 338

- Grillenberger A. & Fritsch E.** (2007) Computertomographie: Einführung in ein modernes bildgebendes Verfahren. *Facultas Universitätsverlag* (Wien)
- Haberkorn U., Altmann A., Kamencic H., Morr I., Traut U., Henze M., Jiang S., Metz J., Kinscherf R.** (2001) Glucose transport and apoptosis after gene therapy with HSV thymidine kinase. *European Journal of Nuclear Medicine* 28:1690 - 1696
- Hackstadt, T.** (1999) Cell Biology in: Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity (Edited by Stephens, R. S.) *ASM Press*, Washington DC, pp. 101 - 138
- Hamburger V. & Hamilton H. L.** (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 88 (1): 49 - 92
- Hara K. & Harris A.** (2002) The anesthetic mechanism of urethan: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesthetic Pharmacology* 94: 313 - 318
- Harkinezhad T., Greens T., Vanrompay D.** (2009) *Chlamydophila psittaci* infections in birds: A review with emphasis on zoonotic consequences. *Veterinary Microbiology* 135 (1-2): 68 - 77
- Hatch T. P., Al-Hossainy E., Silverman J. A.** (1982) Adenine nucleotide and lysine transport in *Chlamydia psittaci*. *Journal of Bacteriology* 150 (2): 662 - 670
- Hayden M. S., West A. P., Ghosh S.** (2006) NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25: 6758 - 6780
- Heidrich A., Würbach L., Opfermann T., Saluz H.-P.** (2011) Motion-artifact-free *in vivo* imaging utilizing narcotized avian embryos *in ovo*. *Molecular Imaging and Biology* 13 (2): 208 - 214
- Heinmets F. & Golub O. J.** (1948) Observations on the growth of psittacosis virus in chorioallantoic membranes by electron microscope. *Journal of Bacteriology* 56(5): 509 - 525
- Heinzen R. A., Scidmore M. A., Rockey D. D., Hackstadt T.** (1996) Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity* 64 (3): 796 - 809
- Herholz K., Carter S. F., Jones M.** (2007) Positron emission tomography imaging in dementia. *British Journal of Radiology* 80 (2): 160 - 167
- Heuer D., Lipinski A. R., Machuy N., Karlas A., Wehrens A., Siedler F., Brinkmann V., Meyer T. F.** (2009) Chlamydia causes fragmentation of the golgi compartment to ensure reproduction. *Nature Letters* 457: 731 - 737
- Hildebrandt I. J., Su H., Weber W. A.** (2008) Anesthesia and other considerations for *in vivo* imaging of small animals. *ILAR Journal* 49 (1): 17-26
- Hodinka R. L., Davis C. H., Choong J., Wyrick P. B.** (1988) Ultrastructural study of endocytosis of *Chlamydia trachomatis* by McCoy cells. *Infection and Immunity* 56 (6): 1456-63
- Huang Z., Feng Y., Chen D., Wu X., Huang S., Wang X., Xiao X., Li W., Huang N., Gu L., Zhong G., Chai J.** (2008) Structural basis for activation and inhibition of the secreted Chlamydia protease CPAF. *Cell Host & Microbe* 4: 529 - 542
- Hybiske K., Stephens R. S.** (2007) Mechanisms of *Chlamydia trachomatis* Entry into Nonphagocytic Cells. *Infection and Immunity* 75 (8): 3925 - 3934

- Jacobsen I. D., Große K., Berndt A., Hube B.** (2011) Pathogenesis of *Candida albicans* infections in the alternative Chorio-Allantoic membrane chicken embryo model resembles systemic murine infections. *PLoS ONE* 6(5): e19741
- Jewett T. J., Fischer E. R., Mead D. J., Hackstadt T.** (2006) Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* 103:15599 - 15604
- Jilani S. M., Murphy T. J., Thai S. N. M., Eichmann A., Alva J. A., Iruela-Arispe M. L.** (2003) Selective binding of lectins to embryonic chicken vasculature. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 61 (6): 597 - 604
- Löscher W.**, (2006) Pharmaka mit Wirkung auf das Zentralnervensystem. In: Löscher, W., F.R. Ungemach und R. Kroker.: *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. Parey-Verlag, Stuttgart, 7. Auflage: 63 - 124
- Johnston P. M. & Comar C. L.** (1955). Distribution and contribution of calcium from the albumen, yolk, and shell to the developing chick embryo. *American Journal of Physiology* 183: 365 – 370
- Jolles P. R., Chapman P. R., Alavi A.** (1989) PET, CT, and MRI in the evaluation of neuropsychiatric disorders : current applications. *Journal of Nuclear Medicine* 30: 1589 - 1606
- Jong W. M. C., Zuurbier C. T. J., De Winter R., Van Den Heuvel D. A. F., Reitsma P. H., Cate H. T., Ince C.** (2002) Fentanyl-fluanisone-midazolam combination results in more stable hemodynamics than does urethane- $\alpha$ -Chloralose and 2,2,2-tribromoethanol in mice. *Contemporary Topics* 41 (3): 28 - 32
- Keijsers R. g. M., Verzijbergen J. F., van Diepen D. M., van den Bosch J. M. M., Grutters J. C.** (2008)  $^{18}\text{F}$ -FDG PET in sarcoidosis: an observational study in 12 patients treated with infliximab. *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases* 25: 143 - 150
- Kaltenboeck B., Kousoulas K. G., Storz J.** (1993) Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (ompA) genes of the four chlamydial species. *Journal of Bacteriology* 175: 487 - 502
- Kamel E. M., Thumshirn M., Truninger K., Schiesser M., Fried M., Padberg B., Schneider D., Stoeckli S. J., Schulthess G. K., Stumpe K.** (2004) Significance of incidental  $^{18}\text{F}$ -FDG accumulations in the gastrointestinal tract in PET/CT: correlation with endoscopic and histopathologic results. *Journal of Nuclear Medicine* 45 (11): 1804 - 1810
- Kapoor V., McCook B. M., Torok F. S.** (2004) An introduction to PET/CT imaging. *RadioGraphics* 24: 523 - 543
- Kaspers B. & Göbel T.** (2000) Das adaptive Immunsystem des Haushuhns, Einführung. *LOHMANN Information* 1: 1 - 5
- Krauss H. & Schmeer N.** (1992): Aviäre Chlamydiose. In: Heider, G. und Monreal, G. (Hrsg.), *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels*, Gustav Fischer Verlag, Jena und Stuttgart, Band II, S. 277 - 308
- Kumar R., Basu S., Torigian D., Anand V., Zhuang H., Alavi A.** (2008) Role of modern imaging techniques for diagnosis of infection in the era of  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Clinical Microbiology Reviews* 21 (1): 209 - 224
- Kumar Y., Cocchiaro J., Valdivia R. H.** (2006) The obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* targets host lipid droplets. *Current Biology* 16: 1646 - 1651

- Lad S. P., Li J., da Silva Correia J., Pan Q., Gadwal S., Ulevitch R. J., Li E.** (2007) Cleavage of p65/RelA of the NfκappaB pathway by *Chlamydia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 104: 2933 - 2938
- Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 - 685
- Lane B. J., Mutchler C., Al Khodor S., Grieshaber S. S., Carabeo R. A.** (2008) Chlamydial entry involves TARP binding of guanine nucleotide exchange factors. *PLoS Pathogens* 4 (3): e1000014
- Leng T., Miller J. M., Bilbao K., Palanker D. V., Huie P., Blumankranz M. S.** (2004) The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation. *Retina* 24: 427 - 434
- Louis E., Ancion G., Colard A., Spote V., Belaiche J., Hustinx R.** (2007) Noninvasive assessment of Crohn's disease intestinal lesions with <sup>18</sup>F-FDG PET/CT. *Journal of Nuclear Medicine* 48 (7): 1053 - 1059
- Love C., Tomas M. B., Tronco G. G., Palestro C. J.** (2005) FDG PET of infection and inflammation. *RadioGraphics* 25: 1357 - 1368
- Majeed M. & E. Kihlstrom E.** (1991) Mobilization of F-actin and clathrin during redistribution of *Chlamydia trachomatis* to an intracellular site in eucaryotic cells. *Infection and Immunity* 59: 4465 - 4472
- Massoud T. F. & Gambhir S. S.** (2003) Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes & Development* 17: 545 - 580
- Mayr A., Bachmann P. A., Bibrack B., Wittmann G.** (1974) Virologische Arbeitsmethoden. Band I Zellkulturen – Bebrütete Hühnereier – Versuchstiere. pp. 375 - 384 *VEB Gustav Fischer Verlag*
- McClarty G. & Fan H.** (1993) Purine Metabolism by intracellular *Chlamydia psittaci*. *Journal of Bacteriology* 175 (15): 4662 - 4669
- Meade K. G., Higgs R., Lloyd A. T., Giles S., O'Farrelly C.** (2009) Differential antimicrobial peptide gene expression patterns during early chicken embryological development. *Development & comparative Immunology* 33 (4): 516 - 524
- Menna T. M. & Mortola J. P.** (2002) Metabolic control of pulmonary ventilation in the developing chick embryo. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 130: 43 - 55
- Moulder J. W.** (1966). The relation of the psittacosis group (chlamydiae) to bacteria and viruses. *Annual Review of Microbiology* 20: 107 - 130
- Moulder J. W.** (1970) Glucose metabolism of L-cells before and after infection with *Chlamydia psittaci*. *Journal of Bacteriology* 104 (3): 1189 - 1196
- Moulder J. W.** (1991) Interaction of *Chlamydiae* and host cells in vitro. *Microbiological Reviews* 55: 143 - 190
- Mountz J. M.** (2007 a) PET/CT neuroimaging applications in dementia. *Applied Radiology* 6: 4 - 12
- Mountz J. M.** (2007 b) PET/CT neuroimaging applications for epilepsy and cerebral neoplasm. *Applied Radiology* 11: 44 - 52

- Negrate G., Krieg A., Faustin B., Loeffler M., Godzik A., Krajewski S., Reed J. C. (2008)**  
*ChlaDub1 of Chlamydia trachomatis suppresses NF- $\kappa$ B activation and inhibits IkBa ubiquitination and degradation. Cellular Microbiology 10: 1879 - 1892*
- New D.A.T. (1966)** The Culture of Vertebrate Embryos, pp. 1–245, London: Logos Press
- Nuechter H. (2004)**: Nachweis von Chlamydophila psittaci in unterschiedlichen Bereichen in zwei Hähnchen- und zwei Putenschlachtereien mittels direkter Immunfluoreszenz nach Erregeranzüchtung in Buffalo-Green-Monkey-Kidney-Zellkulturen sowie der Polymerase-Ketten-Reaktion mit anschließender Restriktionsenzymanalyse. Veterinärmedizinische Dissertation, Gießen
- Ojcius D. M., Degani H., Mispelter J., Dautry-Varsat A. (1998)** Enhancement of ATP levels and glucose metabolism during an infection by *Chlamydia*. *Journal of Biological Chemistry* 273 (12): 7052 - 7058
- Page L. A. (1959)** Experimental ornithosis in turkeys. *Avian Diseases* 3: 51 - 66
- Page L. A. (1968)** Proposal for the recognition of two species in the genus *Chlamydia* Jones, Rake, and Stearns, 1945. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology* 18: 51 - 66
- Page L. A. & Grimes J. E. (1984)**: Avian Chlamydiosis (Ornithosis). In: Hofstad, M. S. (Ed.), Diseases of Poultry, 8th Edition, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp. 283 - 308
- Papaioannou V. E., Fox J. G. (1993)** Efficacy of tribromoethanol anesthesia in mice. *Labaratory Animal Science* 43 (2): 189 - 192
- Partridge B. M., Athar M. A., Winner H. I. (1971)** Chick embryo inoculation as a pathogenicity test for *Candida* species. *Journal of Clinical Pathology* 24: 645 - 648
- Paschen S. A., Christian J. G., Vier J., Schmidt F., Walch A., Ojcius D. M., Hacker G. (2008)**  
Cytopathicity of *Chlamydia* is largely reproduced by expression of a single chlamydial protease. *Journal of Cell Biology* 182: 117 - 127
- Perk L. R., Vosjan M. J. W. D., Visser G. W. M., Budde M., Jurek P., Kiefer G. E., van Dongen G. A. M. S. (2010)** p-Isotiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new biofunctional chelat for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. *Eur J Nucl Med mod Imaging* 37: 250 - 259
- Phelps M. E. (2000)** PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging. *Journal of Nuclear Medicine* 41: 661 - 681
- Piwnika-Worms D., Schuster D. P., Garbow J. R. (2004)** Molecular imaging of host-pathogen interactions in intact small animals. *Cellular Microbiology* 6 (4): 319 - 331
- Rajalingam K., Sharma M., Lohmann C., Oswald M., Thieck O., Froelich C.J., Rudel T. (2008)**  
Mcl-1 is a key regulator of apoptosis resistance in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *PLoS ONE* 3: e3102.
- Read T.D., Myers G. S. A., Brunham R. C., Nelson W. C., Paulsen I. T., Heidelberg J. (2003)**  
Genome sequence of *Chlamydophila caviae* (*Chlamydia psittaci* GPIC): examining the role of niche-specific genes in the evolution of the Chlamydiaceae. *Nucleic Acids Research* 31 (8): 2134 - 2147



- Reeps C., Gee M. W., Maier A., Pesilek J., Gurdan M., Wall W., Mariss J., Eckstein H.-H., Essler M.** (2009) Glucose Metabolism in the Vessel Wall Correlates With Mechanical Instability and Inflammatory Changes in a Patient With a Growing Aneurysm of the Abdominal Aorta. *Circulation: Cardiovascular Imaging* 2: 507 - 509
- Rennen H., Boerman O. C., Oyen W. J. G., Corstens F. H. M.** (2001) Imaging infection/inflammation in the new millennium. *European Journal of Nuclear Medicine* 28: 241 - 252
- Ribatti D., Nico B., Vacca A., Roncali L., Burri P. H., Djonov V.** (2001) Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anatomical Record* 264: 317 - 324
- Rockey D. D., Fischer E. R., Hackstadt T.** (1996) Temporal analysis of the developing *Chlamydia psittaci* inclusion by use of fluorescence and electron microscopy. *Infect Immun* 64: 4269 - 4278
- Rohde G., Straube E., Essig A., Reinhold P., Sachse K.** (2010) Chlamydiale Zoonosen. *Deutsches Ärzteblatt International* 107 (10): 174 - 180
- Romanoff A. L.** (1960) The Avian Embryo. Structural and functional development. *Macmillan* (New York)
- Romanoff A. I.** (1967) Biochemistry of the avian embryo: a quantitative analysis of prenatal development. *Wiley* (New York)
- Saka H. A. & Valdivia R. H.** (2010) Acquisition of nutrients by *Chlamydiae*: unique challenges of living in an intracellular compartment. *Current Opinion in Microbiology* 13 (1): 4 - 10
- Schulze D.** (2007) Bildgebende Diagnostik in der Zahnheilkunde. *DIGITAL\_DENTALNEWS* 16-20
- Schuster D., Kozlowski J., Hogue L., Ferkol T.** (2003) Imaging lung inflammation in a murine model of *Pseudomonas* infection: a positron emission tomography study. *Experimental Lung Research* 29: 45 - 57
- Schwaiger M., Ziegler S., Nekolla S. G.** (2005) PET/CT: challenge for nuclear cardiology. *Journal of Nuclear Medicine* 46 (10): 1664 - 1678
- Seemann G.** (2005) Erzeugung und Bedeutung von SPF-Bruteiern. *LOHMANN Information* 3: 1 - 7
- Shim S. S., Lee K. S., Kim B.-T., Chung M. J., Lee E. J., Han J., Choi J. Y., Kwon O. J., Shim Y. M., Kim S.** (2005) Non-small cell lung cancer: prospective comparison of integrated FDG PET/CT and CT alone for preoperative staging. *Radiology* 236: 1011 - 1019
- Slodownik D., Grinberg I., Spira R. M., Skornik Y., Goldstein R. S.** (2008) The human skin/chick chorioallantoic membrane model accurately predicts the potency of cosmetic allergens. *Experimental Dermatology* 18: 409 - 413
- Stark J. M.** (1999) Functional capacities of extraembryonic organs in bird embryos. In: Adams, N. J. & Slotow, R. H. (eds) Proc. 22 International Ornithology Congress, Durban: 2836-2856
- Staton C. A., Stribbling S. M., Tazzyman s., Hughes R., Brown N. J., Lewis C. E.** (2004) Current methods for assaying angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 85: 233 - 248

- Stenner-Liewen F., Liewen H., Zapata J., Pawlowski K., Godzik A., Reed J. C.** (2002) CADD, a *Chlamydia* protein that interacts with death receptors. *Journal of Biological Chemistry* 277 (12): 9633 - 9636
- Stephens R. S., Kalman S., Lammel C.; Fan J., Marathe R., Aravind L., Mitchell W., Olinger L., Tatusov R. L., Zhao Q., Koonin E. V., Davis R. W.** (1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 282: 754 - 759
- Stern C. D.** (2004) The chick embryo-past, present and future as a model system in developmental biology. *Mechanisms of Development* 121: 1011 - 1013
- Stern C. D.** (2005) The chick: a great model system becomes even greater. *Developmental cell* 8: 9 - 17
- Storz J. & Krauss H.** (1985): Chlamydia. In: Blobel, H. und Schliesser, T. (Hrsg.): Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 447 - 531
- Su H., McClarty G., Dong F., Hatch G. M., Pan Z. K., Zhong G.** (2004) Activation of Raf/MEK/ERK/cPLA2 signaling pathway is essential for chlamydial acquisition of host glycerophospholipids. *Journal of Biological Chemistry* 279: 9409 - 9416
- Sugawara Y., Gutowski T. D., Fisher S. J., Brown R. S., Wahl R. L.** (1999) Uptake of positron emission tomography tracers in experimental bacterial infections: a comparative biodistribution study of radiolabeled FDG, thymidine, L-methionine, <sup>68</sup>Ga-citrate, and <sup>125</sup>I-HSA. *European Journal of Nuclear Medicine* 26 (4): 333 - 341
- Sugijama T., Miyazaki H., Saito K., Shimada H., Miyamoto K.** (1996) Chick embryos as an alternative experimental animal for cardiovascular investigations: stable recording of electrocardiogram of chick embryos *in ovo* on the 16<sup>th</sup> day of incubation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 138 (2): 262 - 267
- Sun S. C., Ley S. C.** (2008) New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends in Immunology* 29: 469 - 478
- Sunny N. E. & Bequette B. J.** (2010) Gluconeogenesis differs in developing chick embryos derived from small compared with typical size broiler breeder eggs. *Journal of Animal Science* 88: 912 - 921
- Tamm I. & Tyrrell A. J.** (1954) Influenza virus multiplication in the chorioallantoic membrane in vitro: kinetic aspects of inhibition by 5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosyl-benzimidazole. *Journal of Experimental Medicine* 100 (6): 541 - 562
- Tazawa H.** (1980) Oxygen and CO<sub>2</sub> exchange and acid-base regulation in the avian embryo. *American Zoologist* 20: 395 - 404
- Tazawa H.** (1981) Measurement of blood pressure of chick embryo with an implanted needle catheter. *Journal of Applied Physiology* 51 (4): 1023 - 1026
- Tjaden J., Winkler H. H., Schwöppe C., van der Laan M., Möhlmann T., Neuhaus H. E.** (1999) Two nucleotide transport proteins in *Chlamydia trachomatis*, one for net nucleoside triphosphate uptake and the other for transport of energy. *Journal of Bacteriology* 181 (4): 1196 - 1202
- Toyama H., Ichise M., Liow J. S., Vines D. C., Seneca N. M., Modell K. J., Seidel J., Green M. V., Innis R. B.** (2004) Evaluation of anesthesia effects on [18F]FDG uptake in mouse brain and heart using small animal PET. *Nuclear Medicine and Biology* 31 (2): 251 - 256

- Truijers M., Kurvers H. A. J. M., Bredie S. J. H., Oyen W. J. G., Blankensteijn J. D.** (2008) In vivo imaging of abdominal aortic aneurysms: aneased FDG uptake suggests inflammation in the aneurysm wall. *Journal of Endovascular Therapy* 15 (4): 462 - 467
- Tufan A. C., Akdogan I., Adiguzel E.** (2004) Shell-less culture of the chick embryo as a model system in the study of developmental neurobiology. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 3: 8 - 11
- Uni Z., Ferket P. R., Tako E., Kedar O.** (2005) In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poultry Science* 84: 764 - 770
- Valdes T I., Kreutzer D., Moussy F.** (2002) The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research* 62 (2): 273 - 282
- Van Golde J., Mulder T., Straaten H. V., Blanco C. E.** (1996) The chorioallantoic artery blood flow of the chick embryo from stage 34 to 43. *Pediatric Research* 40: 867 - 871
- Vos F. J., Bleeker-Rovers C. P., Corstens F. H. M., Kullberg B. J., Oyen W. J. G.** (2006) FDG-PET for imaging of non-osseous infection and inflammation. *Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 50: 121 - 130
- Weissleder R. & Pittet M. J.** (2008) Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 452 (7187): 580 - 589
- Meijs W. E., Haisma H. J., Klok R. P., van Gog F. B., Kievit E., Pinedo H. M., Herscheid J. D. M.** (1997) Zirconium-labeled monoclonal antibodies and their distribution in tumor-bearing nude mice. *Journal of Nuclear Medicine* 38: 112 - 118
- Wojtczak J. A.** (2000) The Hemodynamic Effects of Halothane and Isoflurane in Chick Embryo. *Anesthesia & Analgesia* 90 (6): 1331 - 1335
- Wolpert L.** (2004) Much more from the chicken's egg than breakfast-a wonderful model system. *Mechanisms of Development* 121: 1015 - 1017
- Würbach L., Heidrich A., Opfermann T., Gebhardt P., Saluz H. P.** (2012) Insights into bone metabolism of avian embryos *in ovo* via 3D and 4D (18)F-fluoride Positron Emission Tomography. *Molecular Imaging and Biology* DOI: 10.1007/s11307-012-0550-6
- Wyrick P. B.** (2010) *Chlamydia trachomatis* persistence *in vitro*: an overview. *Journal of Infectious Diseases* 201 (2): 88 - 95
- Zhao Y., Wieman H. L., Jacobs s. R., Rathmell J. C.** (2009) Mechanisms and methods in glucose metabolism and cell death. *Methods in Enzymology* 442: 439 - 457
- Zhong G., Fan P., Ji H., Dong F., Huang Y.** (2001) Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *Journal of Experimental Medicine* 193: 935 - 942

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Längsschnitt durch ein Hühnerei zwischen dem 10. und 12. Bebrütungstag	3
Abb. 2: Schematische Darstellung des chlamydialen Lebenszyklus	5
Abb. 3: Prinzip der Annihilierung	10
Abb. 4: [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Aufnahme und Akkumulation	12
Abb. 5: Aufbau des Katheters zur intravaskulären Applikation	26
Abb. 6: Vorbereitung der Eier zur intravaskulären Applikation	27
Abb. 7: Halbseitiges adhären von Zellen auf einer Petrischale	29
Abb. 8: Messpunkte des LigandTracer® - Systems zur Ermittlung der Daten eines Max – Min - Blots aus einer 3+3-Messeinstellung	30
Abb. 9: [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation in <i>Cp. psittaci</i> - infizierten BGM - Zellen nach 24 Stunden im Vergleich zu nicht - infizierten Zellen	31
Abb. 10: Schematische Darstellung des PET / CT - Messablaufs von Hühnerembryonen <i>in ovo</i>	36
Abb. 11: CT - Aufnahmen nicht - anästhesierter Hühnerembryonen an Bruttag 10, 14 und 17	39
Abb. 12: Verwendete Dosierungen des Urethan / $\alpha$ – Chloralose - Narkotikums zur Anästhesie von Hühnerembryonen <i>in ovo</i> an Bruttag 10 bis 18	40
Abb. 13: CT - Aufnahmen der mit Urethan / $\alpha$ - Chloralose anästhesierten Hühnerembryonen <i>in ovo</i> an Bruttag 10 bis 18 im Vergleich mit unanästhesierten Embryonen	41
Abb. 14: Verwendete Dosierungen des Avertin - Narkotikums zur Anästhesie von Hühnerembryonen <i>in ovo</i> an Bruttag 10 bis 18	42
Abb. 15: CT - Aufnahmen der mit Avertin anästhesierten Hühnerembryonen <i>in ovo</i> an Bruttag 10 bis 18 im Vergleich mit unanästhesierten Embryonen	42
Abb. 16: Beurteilung der Anästhesie mit Isofluran anhand der Bewegung von Hühnerembryonen <i>in ovo</i> an Bruttag 10 und 13	43
Abb. 17: Inkubationszeiten des Isofluran - Anästhetikums bei Embryonen an Bruttag 10 bis 18	44
Abb. 18: CT - Bilder der mit Isofluran anästhesierten Hühnerembryonen an Bruttag 10 bis 18 im Vergleich mit unanästhesierten Embryonen	44
Abb. 19: PET / CT - Aufnahme der physiologischen Verteilung des Tracers [ $^{18}\text{F}$ ] – Fluorid	48
Abb. 20: PET / CT - Darstellung der Ossifikation eines Hühnerembryos nach wiederholender intravaskulärer Applikation von [ $^{18}\text{F}$ ] - Fluorid an Entwicklungstag 13, 14 und 15	48
Abb. 21: CT - Aufnahmen von Hühnerembryonen <i>in ovo</i> an Bruttag 17	50
Abb. 22: [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation <i>Cp. psittaci</i> - infizierter Zellen im Vergleich zu nicht - infizierten Zellen	53
Abb. 23: <i>In ovo</i> [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Verteilung in nicht - infizierten Hühnerembryonen (Bruttag 16)	54
Abb. 24: Mittelwerte und Standardabweichungen der % ID / g von [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG in verschiedenen Gewebeproben <i>in ovo</i> an Bruttag 16	56

Abb. 25: <i>In ovo</i> [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Verteilung nach Infektion von Hühnerembryonen an Bruttag 16 mit <i>Cp. Psittaci</i>	57
Abb. 26: Histologische Darstellung der Leber von <i>Cp. psittaci</i> - infizierten Embryonen	59
Abb. 27 : Histologische Darstellung der Milz <i>Cp. psittaci</i> - infizierter Embryonen	60
Abb. 28: Physiologische Verteilung von $^{89}\text{Zr}$ <i>in ovo</i> (Bruttag 16)	62
Abb. 29: Physiologische Verteilung des $^{89}\text{Zr}$ - markierten anti – Chlamydia – LPS – Antikörpers <i>in ovo</i> (Bruttag 16)	63

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Puffer und Medien	17
Tab. 2: Lösungen und deren Zusammensetzung	17
Tab. 3: Chemikalien / Radionuklide	19
Tab. 4: Geräte	20
Tab. 5: Verbrauchsmaterialien	21
Tab. 6: Verdünnungsstufen zur Titerbestimmung von <i>Cp. psittaci</i>	24
Tab. 7: Geräteparameter des Computertomographen (CT)	35
Tab. 8: Geräteparameter des PET	37
Tab. 9: Anzahl an lebenden Embryonen nach der Anästhesie mit Urethan / Alpha - Chloralose, Avertin und Isofluran an verschiedenen Bruttagen	46
Tab. 10: Volumina der ROI - Strukturen für Embryonen an Bruttag 16	55
Tab. 11: [ $^{18}\text{F}$ ] - FDG - Aktivität der Kontrollembryonen in % ID / g an Bruttag 16	56
Tab. 12: [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Aktivität der infizierten Embryonen in % ID / g an Bruttag 16	56
Tab. 13: Änderungen der [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG - Akkumulation in infizierten Embryonen bezogen auf Mock - infizierte Kontrollembryonen	58
Tab. 14: Anzahl der <i>Cp. psittaci</i> - Kolonien (cfu) in histologischen Färbungen der Leber von infizierten Embryonen	59
Tab. 15: Anzahl der <i>Cp.psittaci</i> - Kolonien (cfu) in histologischen Färbungen der Milz von infizierten Embryonen	60
Tab. 16: Volumina der ROI-Strukturen für Embryonen an Bruttag 16	64
Tab. 17: $^{89}\text{Zr}$ – Antikörper - Aktivität nicht - infizierter Embryonen in % ID / g 1 Stunde nach Applikation an Bruttag 16	64
Tab. 18: $^{89}\text{Zr}$ – Antikörper - Aktivität nicht - infizierter Embryonen in % ID / g 20 Stunden nach Applikation an Bruttag 16	64
Tab. 19: $^{89}\text{Zr}$ – Antikörper - Aktivität <i>Cp. psittaci</i> infizierter Embryonen in % ID / g 1 Stunde nach Applikation an Bruttag 16	65
Tab. 20: $^{89}\text{Zr}$ -Antikörper-Aktivität <i>Cp. psittaci</i> infizierter Embryonen in %ID/g 20 Stunden nach Applikation an Bruttag 16	65
Tab. 21: Vergleichende Darstellung der [ $^{18}\text{F}$ ] – FDG – Akkumulation mit der Anzahl koloniebildender Einheiten in Leber und Milz von <i>Cp. psittaci</i> – infizierten Hühnerembryonen	84

**Formelverzeichnis**

Formel 1: Berechnung des <i>Cp. psittaci</i> - Titors einer Kryokonserven	24
Formel 2: Berechnung Korrekturfaktor K	31

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Naturstoffforschung und Infektionsbiologie, Hans-Knöll-Institut in Jena, in der Abteilung Zell- und Molekularbiologie, angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans - Peter Saluz, dem ich ausdrücklich für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Abteilung anzufertigen danke. Seine wissenschaftliche Betreuung sowie die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren vielen Dank an meine lieben Kolleginnen und Kollegen für die freundschaftliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft, die meine Arbeit unterstützt haben. Besonders möchte ich an dieser Stelle Dr. Peter Gebhardt, Dr. Thomas Opfermann, Alexander Heidrich sowie Vera Klujewa für die freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung danken.

Dr. Angela Berndt und Katrin Schlehhahn der Arbeitsgruppe Infektionsimmunologie des Friedrich – Löffler - Instituts Jena danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor sowie für die Unterstützung bei der Immunhistologie. Sabine Scharf möchte ich für die Einführung in die Chlamydieninfektion danken. Des Weiteren danke ich Birgit Weber, der Arbeitsgruppe Mikrobielle Pathogenitätsmechanismen des HKI, für die Einführung in die Bebrütungstechnik von Hühnereiern.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie für den privaten Rückhalt bedanken.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist und ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst und für ihre Fertigstellung keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit an noch keiner anderen Hochschule eingereicht und die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe. Dritte haben weder von mir unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich versichere, dass ich die Dissertation mit dem „Etablierung des Hühnerembryonenmodells zur Darstellung von Infektionen mittels Positronenemissionstomographie / Computertomographie (PET / CT) am Beispiel von *Chlamydophila psittaci*“ selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind und mich Prof. Dr. Hans-Peter Saluz bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung der Manuskripte unterstützt hat.

Ich versichere, dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, Oktober 2012



**Lebenslauf**

## PERSÖNLICHE DATEN

Name	Lydia Friedrich, geb. Würbach
Geburtsdatum und –ort	25.08.1981 in Erfurt
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit	BRD

## SCHULBILDUNG

1988 – 1992	Grundschule Witterda
1992 – 1996	Staatliches Gymnasium Gebesee
1996 – 2000	Martin-Luther Gymnasium Erfurt

## BERUFSAUSBILDUNG

2000 – 2003	Biologielaborantin Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co.KG; Biberach / Riss
-------------	--

## STUDIUM

2003 – 2008	Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller Universität Jena; Abschluss als Diplombiologin
2007 - 2008	Diplomarbeit bei Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co.KG; Thema: Optimierung von Antikörperstrukturen
2008 – 2012	PhD Student am Hans-Knöll Institut Jena; Abteilung Zell- und Molekularbiologie

**Publikationen**

Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikationen:

**Walther M., Gebhardt P., Grosse-Gehling P., Würbach L., Irmeler I., Preusche S., Khalid M., Opfermann T., Kamradt T., Steinbach J., Saluz H.-P.** (2011) Implementation of  $^{89}\text{Zr}$  production and in vivo imaging of B-cells in mice with  $^{89}\text{Zr}$ -labeled anti-B-cell antibodies by small animal PET/CT. *Applied Radiation and Isotopes* 69 (6): 827-916

**Heidrich A., Würbach L., Opfermann T., Saluz H. - P.** (2011) Motion-artifact-free *in vivo* imaging utilizing narcotized avian embryos *in ovo*. *Molecular Imaging and Biology* 13 (2): 208-214

**Würbach L., Heidrich A., Opfermann T., Gebhardt P., Saluz H. - P.** (2012) Insights into bone metabolism of avian embryos *in ovo* via 3D and 4D  $(^{18}\text{F})$ -fluoride Positron Emission Tomography. *Molecular Imaging and Biology* DOI: 10.1007/s11307-012-0550-6